



Air minum embun



© BSN 2013

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Komposisi	1
5 Syarat mutu	1
6 Pengambilan contoh.....	2
7 Cara uji	3
8 Syarat lulus uji	3
9 Higiene	3
10 Pengemasan.....	3
11 Syarat penandaan.....	4
Lampiran A (normatif) Cara uji air minum embun.....	5
Bibliografi	62
Tabel 1 - Syarat mutu air minum embun	1
Tabel A.1 – Pelaporan hasil pembacaan.....	9
Tabel A.2 - Reaksi biokimia <i>Escherichia coli</i> pada uji IMVIC	51
Tabel A.3 - Reaksi biokimia dan serologi untuk <i>Salmonella</i> sp.	58
Tabel A.4 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non <i>Salmonella</i> sp.	59

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Air minum embun* ini dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut:

- Melindungi kesehatan konsumen;
- menjamin perdagangan pangan olahan yang jujur dan bertanggung jawab;
- menjaga dan melindungi kelestarian lingkungan; dan
- mendukung perkembangan industri air minum.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan ketentuan pada:

1. Undang-Undang Republik Indonesia No. 5 Tahun 1984 tentang Perindustrian.
2. Undang-Undang Republik Indonesia No. 7 Tahun 1996 tentang Pangan.
3. Undang-Undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
4. Undang-Undang Republik Indonesia No. 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.
5. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan.
7. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia No. 24/M-IND/PER/2/2010 tentang Pencantuman Logo Tara dan Kode Daur Ulang pada Kemasan Pangan dari Plastik.
8. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 492/MENKES/PER/IV/2010 tentang Persyaratan Kualitas Air Minum.
9. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia No. 75/M-IND/PER/7/2010 tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik (*Good Manufacturing Practices*).
10. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No. 907/MENKES/SK/VII/2002 tentang Syarat-syarat dan Pengawasan Kualitas Air Minum.
11. Surat keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan.
12. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.06.1.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Kimia dalam Makanan.

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis (SPT) 67-04-S1 Minuman dan Tembakau, yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 7 Oktober 2011 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, Badan Pengawas Obat dan Makanan dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 27 Februari 2012 sampai dengan tanggal 26 April 2012 dengan hasil akhir RASNI.

Air minum embun

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, syarat mutu, pengambilan contoh, cara uji, pengemasan dan penandaan air minum embun.

2 Acuan normatif

Untuk acuan tidak bertanggal berlaku edisi terakhir (termasuk revisi dan atau amandemen)

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

3 Istilah dan definisi

3.1

air minum embun

air embun yang telah diproses, dikemas, dan aman diminum

3.2

air embun

air yang diperoleh dari udara lembab melalui proses pengembunan yang terkendali

3.3

udara lembab

udara yang menjadi bahan baku air embun yang mempunyai kelembaban nisbi

4 Komposisi

4.1 Bahan baku

Air embun

5 Syarat mutu

Syarat mutu air minum embun sesuai Tabel 1 dibawah ini.

Tabel 1 - Syarat mutu air minum embun

No	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bau	-	tidak berbau
1.2	Rasa	-	Normal
1.3	Warna	Unit Pt-Co	maks. 1,0
2	pH	-	6,0 – 7,5

Tabel 1 (lanjutan)

No	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
3	Zat yang terlarut	mg/L	maks. 5
4	Kekeruhan	NTU	maks. 0,5
5	Nitrat (sebagai NO ₃)	mg/L	maks. 0,5
6	Nitrit (sebagai NO ₂)	mg/L	maks. 0,005
7	Amonia (NH ₃)	mg/L	maks. 1,5
8	Sulfat (SO ₄)	mg/L	maks. 1,0
9	Klorida (Cl)	mg/L	maks. 1,0
10	Fluorida (F)	mg/L	maks. 0,5
11	Sianida (CN)	mg/L	maks. 0,01
12	Besi (Fe)	mg/L	maks. 0,05
13	Mangan (Mn)	mg/L	maks. 0,02
14	Klor bebas (Cl ₂)	mg/L	maks. 0,05
15	Kromium (Cr)	mg/L	maks. 0,02
16	Barium (Ba)	mg/L	maks. 0,02
17	Boron (B)	mg/L	maks. 0,02
18	Selenium (Se)	mg/L	maks. 0,01
19	Timbal (Pb)	mg/L	maks. 0,005
20	Kadmium (Cd)	mg/L	maks. 0,003
21	Tembaga (Cu)	mg/L	maks. 0,01
22	Merkuri (Hg)	mg/L	maks. 0,001
23	Alumunium (Al)	mg/L	maks. 0,01
24	Arsen (As)	mg/L	maks. 0,01
25	Angka lempeng total	koloni/mL	maks. 1,0 x 10 ²
26	Bakteri <i>Coliform</i>	APM/100 mL	< 2
27	<i>E. Coli</i>	APM/100 mL	< 2
28	<i>Salmonella</i>	-	negatif/100 mL
29	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	koloni/mL	0

6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428.

7 Cara uji

Cara uji untuk air minum embun seperti di bawah ini:

- a) Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1
- b) Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2
 - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.1
 - Cara uji rasa sesuai Lampiran A.2.2
 - Cara uji warna sesuai Lampiran A.2.3
- c) Cara uji pH sesuai Lampiran A.3
- d) Cara uji zat yang terlarut sesuai Lampiran A.4
- e) Cara uji kekeruhan sesuai Lampiran A.5
- f) Cara uji nitrat (sebagai NO_3) sesuai Lampiran A.6
- g) Cara uji nitrit (sebagai NO_2) sesuai Lampiran A.7
- h) Cara uji amonia (sebagai NH_3) sesuai Lampiran A.8
- i) Cara uji sulfat (SO_4) sesuai Lampiran A.9
- j) Cara uji klorida (Cl^-) sesuai Lampiran A.10
- k) Cara uji fluorida (F^-) sesuai Lampiran A.11
- l) Cara uji sianida (CN^-) sesuai Lampiran A.12
- m) Cara uji besi (Fe) sesuai Lampiran A.13
- n) Cara uji mangan (Mn) sesuai Lampiran A.14
- o) Cara uji klor bebas (Cl_2) sesuai Lampiran A.15
- p) Cara uji kromium (Cr) sesuai Lampiran A.16
- q) Cara uji barium (Ba) sesuai Lampiran A.17
- r) Cara uji boron (B) sesuai Lampiran A.18
- s) Cara uji selenium (Se) sesuai Lampiran A.19
- t) Cara uji timbal (Pb) sesuai Lampiran A.20
- u) Cara uji kadmium (Cd) sesuai Lampiran A.21
- v) Cara uji tembaga (Cu) sesuai Lampiran A.22
- w) Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.23
- x) Cara uji alumunium (Al) sesuai Lampiran A.24
- y) Cara uji arsen (As) sesuai Lampiran A.25
- z) Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka lempeng total, bakteri *Coliform*, dan *Escherichia coli* sesuai Lampiran A.26
- aa) Cara uji angka lempeng total sesuai Lampiran A.27
- bb) cara uji bakteri *Coliform* dan *E. coli* sesuai Lampiran A.28
- cc) Cara uji *Salmonella* sesuai Lampiran A.29
- dd) Cara uji *Pseudomonas aeruginosa* sesuai Lampiran A.30

8 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu.

9 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

10 Pengemasan

Produk dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

11 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.



Lampiran A
(normatif)
Cara uji air minum embun

A.1 Persiapan contoh

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan uji kimia. Pengambilan contoh uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh uji organoleptik dan uji kimia.

A.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Buka kemasan contoh air minum embun dalam kemasan dan ambil contoh secara aseptik sebanyak 400 mL, kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

A.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik

Buka kemasan contoh air minum embun dalam kemasan dan ambil contoh secukupnya kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.1.3 Persiapan contoh untuk uji kimia

Buka kemasan contoh air minum embun dalam kemasan dan ambil contoh sebanyak 1500 mL kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.2 Keadaan**A.2.1 Bau****A.2.1.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik.

A.2.1.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tercium bau khas air minum embun, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika tercium selain bau khas air minum embun, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.2 Rasa**A.2.2.1. Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik

A.2.2.2. Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan rasakan dengan indera pengecap (lidah); dan
- b) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.2.3. Cara menyatakan hasil

- a) Jika terasa khas air minum embun, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika tidak terasa khas air minum embun, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.3 Warna (Metode Spektrofotometri)

A.2.3.1 Prinsip

Pemeriksaan warna ditentukan dengan membandingkan warna larutan contoh dengan larutan warna standar, yaitu larutan platina kobalt (Pt-Co).

A.2.3.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer sinar tunggal atau sinar ganda yang mempunyai kisaran panjang gelombang 190 sampai dengan 900 nm dengan lebar celah 0,2 sampai dengan 2 mm, terkalibrasi;
- b) Gelas ukur 100 mL;
- c) Buret 10 mL, terkalibrasi;
- d) Labu ukur 50 mL, terkalibrasi;
- e) Erlenmeyer 100 mL; dan
- f) Kertas saring berpori 0,45 μm

A.2.3.3 Pereaksi

Larutan standar

Larutkan 1,246 g kalium kloroplatinat, K_2PtCl_6 (ekivalen dengan 500 mg logam platina) dan 1,00 g kobalt klorida, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (ekivalen dengan 250 mg kobalt) dalam air suling dan 100 mL HCl pekat, encerkan menjadi 1 000 mL dengan air suling. Larutan standar tersebut mempunyai skala warna 500 unit.

A.2.3.4 Cara kerja

- a) Contoh uji disaring dengan kertas saring berpori 0,45 μm , dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer;
- b) Siapkan standar dengan skala warna 5, 10, 15, 20 dan 25 yang diperoleh dari larutan baku dengan skala 500 unit Pt-Co. Pipet 0,5 mL; 1mL; 1,5 mL; 2 mL; dan 2,5 mL larutan standar dalam labu 50 mL, dan tepatkan;
- c) Buat kurva kalibrasi dengan membaca larutan standar dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 456 nm;
- d) Contoh uji yang telah disaring, kemudian dibaca absorbansinya seperti pada larutan standar di atas.

A.2.3.5 Perhitungan

Hitung skala warna hasil metode pemeriksaan spektrofotometri ditetapkan dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

A.3 pH

A.3.1 Prinsip

Metode pengukuran pH secara elektrometri berdasarkan pengukuran aktivitas ion hidrogen dengan menggunakan metode pengukuran secara potensiometri dengan elektroda gelas hidrogen sebagai standar primer dan elektrode kalomel atom perak klorida sebagai pembanding.

A.3.2 Peralatan

- a) pH meter;
- b) Pengaduk magnetik; dan
- c) Gelas piala 250 mL.

A.3.3 Pereaksi

- a) Larutan standar pH; dan
 - Larutan bufer 4
 - Larutan bufer 7
 - Larutan bufer 10
- b) Air suling.

A.3.4 Cara kerja

- a) Kalibrasi pH meter dengan larutan bufer setiap kali akan melakukan pengukuran;
- b) celupkan elektroda yang telah dibersihkan dengan air suling ke dalam contoh yang akan diukur pH-nya; dan
- c) baca dan catat nilai pH.

A.4 Zat yang terlarut (Metode TDS-meter)

A.4.1 Prinsip

Kandungan padatan terlarut total yang bersifat elektrolit dapat ditentukan berdasarkan daya hantar larutan yang sebanding dengan kadarnya.

A.4.2 Peralatan

- a) TDS meter dengan ketelitian 0,1 mg/L terkalibrasi;
- b) Oven terkalibrasi;
- c) Neraca analitik terkalibrasi;
- d) Gelas piala 100 mL;
- e) Labu semprot;
- f) Labu volumetrik 1000 mL; dan
- g) Termometer.

A.4.3 Pereaksi

- a) Air bebas mineral – air dengan Daya Hantar Listrik (DHL) $< 1 \mu\text{S}/\text{Cm}$;
- b) Larutan standar DHL 1413 $\mu\text{S}/\text{CM}$ (KCL 0,01M);
larutkan 0,7456 g KCl yang telah dikeringkan pada suhu 110 °C selama 2 jam dengan air bebas mineral dalam labu volumetrik 1000 mL hingga tanda tera. Larutan ini pada suhu 25 °C mempunyai DHL 1413 $\mu\text{S}/\text{Cm}$.

- c) Larutan standar DHL 12900 $\mu\text{S}/\text{Cm}$ (KCl 0,1M);
larutkan 7,4560 g KCl yang telah dikeringkan pada suhu 110 °C selama 2 jam dengan air bebas mineral dalam labu volumetrik 1000 mL hingga tanda tera. larutan ini pada suhu 25 °C mempunyai DHL 12900 $\mu\text{S}/\text{Cm}$.
- d) Larutan standar DHL 58460 $\mu\text{S}/\text{Cm}$ (KCl 0,5M).
larutkan 37,2800 g KCl yang telah dikeringkan pada suhu 110 °C selama 2 jam dengan air bebas mineral dalam labu volumetrik 1000 mL hingga tanda tera. larutan ini pada suhu 25 °C mempunyai DHL 58460 $\mu\text{S}/\text{Cm}$.

A.4.4 Cara kerja

- a) Cuci elektroda dengan larutan KCl 0,01M sebanyak 3 kali;
- b) atur suhu larutan KCl 0,01M pada 25 °C;
- c) celupkan elektrode ke dalam larutan KCl 0,01M;
- d) tekan tombol kalibrasi;
- e) atur alat sampai menunjukkan angka baca 1413 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (sesuai dengan instruksi kerja alat);
- f) lakukan kalibrasi dengan larutan KCl 0,1 M jika DHL $\pm 12900 \mu\text{S}/\text{cm}$, dan dengan larutan KCl 0,5 M jika DHL $\pm 58460 \mu\text{S}/\text{cm}$;
- g) angkat probe dari larutan uji, bilas dengan air bebas mineral hingga bersih, bersihkan hingga kering menggunakan tisu halus dan kering;
- h) bilas elektrode dengan contoh uji sebanyak 3 kali;
- i) celupkan elektrode ke dalam contoh uji hingga didapat pembacaan DHL yang tetap;
- j) ubah mode pembacaan alat ke satuan mg/L (TDS); dan
- k) catat hasil baca dan suhu uji.

A.4.5 Perhitungan

Hasil yang terbaca pada TDS-meter merupakan kandungan padatan terlarut total.

A.5 Kekeruhan (Metode Nephelometri)

A.5.1 Prinsip

Membandingkan intensitas cahaya dari contoh dengan intensitas cahaya dari suspensi standar pada kondisi tertentu

A.5.2 Peralatan

- a) Turbidimeter (nephelometer);
- b) Tabung nephelometer;
- c) Neraca analitik terkalibrasi;
- d) Labu ukur 100 mL terkalibrasi; dan
- e) Pipet 5 mL dan 10 mL terkalibrasi

A.5.3 Pereaksi

- a) Larutan baku kekeruhan (larutan I);
larutkan 1,0 g hidrazin sulfat $(\text{NH}_2)_2 \text{H}_2\text{SO}_4$ dengan air suling dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- b) Larutan II;
larutkan 10,0 g heksametilen tetramin $(\text{CH}_2)_6\text{O}_4$ dengan air suling dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- c) Larutan standar primer 4000 NTU;

campurkan 5,0 mL larutan I dengan 5,0 mL larutan II kedalam Erlenmeyer. Biarkan selama 24 jam pada suhu $(25 \pm 3) ^\circ\text{C}$. Derajat kekeruhan larutan ini adalah suspensi 4000 NTU.

- d) Suspensi kekeruhan; dan
encerkan larutan standar primer 4000 NTU dengan air bebas kekeruhan. Suspensi ini pada waktu dipakai dalam keadaan segar dan buang setelah dipakai. Standar sekunder adalah standar buatan manufaktur atau organisasi pengujian independen yang telah bersertifikat yang akan memberikan hasil kalibrasi instrumen yang sama dengan hasil kalibrasi instrumen yang dikalibrasi dengan standar primer seperti formazin yang disiapkan oleh analis.
- e) Air bebas kekeruhan;
Air suling yang sudah mengalami 2 kali penyulingan dan penyaringan melalui kertas berpori $0,45 \mu\text{m}$.

A.5.4 Cara kerja

- a) Kalibrasi alat;
kalibrasi alat nephelometer dengan beberapa standar kekeruhan.
- b) kocok contoh dengan sempurna, diamkan sampai gelembung udara hilang, kemudian tuangkan contoh ke dalam tabung nephelometer;
- c) baca nilai kekeruhan pada skala alat tersebut. Untuk contoh yang derajat kekeruhan > 40 NTU, maka cuplikan diencerkan dengan air bebas kekeruhan hingga mencapai kekeruhan 30 NTU sampai dengan 40 NTU.

A.5.5 Perhitungan

Tabel A.1 – Pelaporan hasil pembacaan

No	Jarak kekeruhan NTU	Pelaporan paling mendekati (NTU)
1	0 – 1,0	0,05
2	1 – 10	0,1
3	10 – 40	1
5	400 – 1 000	50
6	$> 1\ 000$	100

A.6 Nitrat (sebagai NO_3) (Metode Spektrofotometri)

A.6.1 Prinsip

Penambahan sejumlah larutan asam klorida ke dalam larutan yang mengandung ion nitrat menyebabkan perubahan pada spektrum absorben nitrat yang dapat diukur dengan Spektrofotometer ultraviolet pada panjang gelombang 220 nm dan 275 nm.

A.6.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer sinar tunggal atau sinar ganda yang mempunyai kisaran panjang gelombang 190 nm sampai dengan 900 nm dan lebar celah 0,2 nm sampel dengan 2 nm serta telah dikalibrasi;
- b) Labu ukur 50 mL, terkalibrasi;
- c) Erlenmeyer 100 mL;
- d) Pipet volume 50 mL, terkalibrasi; dan
- e) Semimikroburet 10 mL, terkalibrasi.

A.6.3 Pereaksi

- a) Air bebas nitrat;
Air suling yang telah mengalami 2 kali penyulingan.
- b) Larutan intermediet; dan
panaskan serbuk kalium nitrat, KNO_3 , dalam oven pada suhu 105°C selama 24 jam. Larutkan 0,7218 g dalam air suling bebas nitrat, encerkan hingga 1000 mL. $1\text{ mL} = 100\text{ }\mu\text{g NO}_3\text{-N}$. Pengawetan dilakukan dengan menambahkan 2 mL CHCl_3 . Larutan ini stabil selama 6 bulan.
- c) Larutan HCl 1 N.

A.6.4 Cara kerja

- a) Pembuatan kurva kalibrasi;
buat larutan standar kalibrasi nitrat dengan kepekatan $1\text{ mg NO}_3\text{-N /L}$; $2\text{ mg NO}_3\text{-N /L}$; $3\text{ mg NO}_3\text{-N /L}$; $4\text{ mg NO}_3\text{-N /L}$; dan $5\text{ mg NO}_3\text{-N /L}$ dengan cara pipet masing-masing 0,5 mL; 1 mL; 1,5 mL; 2,0 mL; dan 2,5 mL larutan intermediet nitrat ke dalam labu ukur 50 mL. Impitkan volumenya sampai tanda tera dengan air suling bebas nitrat;
- b) pipet contoh 50 mL dan masukkan ke dalam Erlenmeyer 100 mL;
- c) tambahkan 1 mL HCl 1 N ke dalam larutan standar dan contoh; dan
- d) periksa contoh dan standar pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 220 nm dan 275 nm.

A.6.5 Perhitungan

- a) Hitung hasil pengurangan pembacaan absorben standar dan contoh dari panjang gelombang 220 nm dengan panjang gelombang 275 nm;
- b) buatlah kurva kalibrasi konsentrasi dan absorben standar hasil pengurangan; dan
- c) hitung konsentrasi contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier, dari hasil pengurangan absorben pada panjang gelombang 220 nm dan 275 nm.

A.7 Nitrit (sebagai NO_2) (metode spektrofotometri)**A.7.1 Prinsip**

Prinsip pengukuran kadar nitrit adalah berdasarkan pembentukan warna kemerah-merahan yang terjadi bila mereaksikan nitrit dengan asam sulfanilat dan N-(1-naftil etilendiamin dihidroklorida) pada pH 2,0 sampai pH 5,2. Warna yang terbentuk dibaca pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 543 nm.

A.7.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer sinar tunggal atau sinar ganda yang mempunyai kisaran panjang gelombang 190 nm sampai dengan 900 nm dan lebar celah 0,2 nm sampai dengan 2 nm serta telah dikalibrasi;
- b) Pemanas listrik yang dilengkapi dengan pengatur suhu;
- c) Labu penyuling 1 000 mL;
- d) Labu ukur 100 mL dan 1 000 mL, terkalibrasi;
- e) Erlenmeyer 100 mL dan 250 mL;
- f) Gelas piala 500 mL;
- g) Buret 50 mL, terkalibrasi;
- h) Gelas ukur 50 mL;

- i) Pipet ukur 10 mL dan 50 mL, terkalibrasi; dan
- j) Mikro buret ukuran 0,25 mL; 0,50 mL; dan 1,00 mL, terkalibrasi;

A.7.3 Pereaksi

- a) Larutan baku 250 mg NO_2 - N/L;
larutkan 1,232 g natrium nitrit, NaNO_2 , dengan air suling 100 mL di dalam labu ukur 1000 mL. Tambahkan 1 mL kloroform sebagai pengawet dan tambahkan air suling sampai tepat pada tanda garis.
- b) Larutan asam sulfanilat;
larutkan 5,0 g sulfanilamid dengan campuran 50 mL HCl pekat dan 300 mL akuabides di dalam gelas piala 500 mL. Encerkan dengan air suling sehingga volumenya menjadi 500 mL.
- c) Larutan naftil etilendiamin dihidroklorida;
larutkan 500 mg N-(1-naftil etilendiamin dihidroklorida) dengan 100 mL air suling di dalam gelas piala 500 mL. Encerkan dengan air suling sehingga volumenya menjadi 500 mL, simpan di dalam botol berwarna gelap dan larutan ini harus diganti setiap bulan atau bila warna larutan menjadi coklat tua.
- d) Larutan asam klorida, HCl, 1 : 3;
tambahkan 50 mL HCl pekat ke dalam gelas piala 250 mL yang berisi 150 mL air suling.
- e) Larutan natrium oksalat, $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, 0,05 N;
larutkan 3,350 g kristal natrium oksalat dengan 100 mL air suling di dalam labu ukur 1000 mL. Tambahkan air suling sampai tepat pada tanda garis.
- f) Larutan fero amonium sulfat;
larutkan 19,607 g fero amonium sulfat dan 20 mL asam sulfat pekat ke dalam labu ukur 1000 mL yang berisi 100 mL air suling. Tambahkan air suling sampai tepat pada tanda garis.
- g) Larutan standar kalium permanganat, KMnO_4 , 0,05 N; dan
larutkan 8,0 g KMnO_4 dalam 1 L air suling, simpan dalam botol berwarna coklat biarkan selama 7 hari.

Penetapan normalitas KMnO_4 :

- Timbang 100 mg sampai dengan 200 mg $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (g) anhidrat ke dalam gelas piala;
- tambahkan 100 mL air suling aduk sampai larut, tambahkan 10 mL H_2SO_4 1 : 1, panaskan gelas piala pada suhu 90°C sampai 95°C ;
- segera titar dengan KMnO_4 yang akan ditetapkan sampai terjadi warna merah jambu terang (V_1);
- pada waktu penitaran, pertahankan suhu pada 85°C . Jika perlu panaskan gelas piala selama penitaran;
- kerjakan penetapan blanko seperti di atas dengan memakai air suling dan H_2SO_4 1:1 (V_2).

Perhitungan :

$$\text{Normalitas } \text{KMnO}_4 \text{ (N)} = \frac{g \times \text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4}{(V_1 - V_2) \times 0,33505}$$

Keterangan:

- g adalah bobot $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ yang digunakan, dinyatakan dalam miligram (mg)
- V_1 adalah volume larutan KMnO_4 yang digunakan untuk titrasi $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- V_2 adalah volume larutan KMnO_4 yang digunakan untuk titrasi blanko, dinyatakan dalam mililiter (mL).

- h) Air suling bebas nitrit.

masukkan satu butir kristal kecil kalium permanganat dan barium hidroksida atau kalsium hidroksida ke dalam labu penyuling 1000 mL yang berisi 500 mL air suling. Lakukan penyulingan dan buang 50 mL air suling yang pertama dan tampung air yang berikutnya.

A.7.4 Cara kerja

A.7.4.1 Penetapan kadar larutan baku nitrit

- Pipet 50 mL larutan baku nitrit, 50 mL larutan KMnO_4 0,05 N, dan 5 mL H_2SO_4 p.a ke dalam labu Erlenmeyer 250 mL;
- kocok dan panaskan di atas pemanas listrik pada suhu 70°C sampai dengan 80°C , hilangkan warna KMnO_4 dengan penambahan 10 mL larutan natrium oksalat 0,05 N;
- titrasi kelebihan natrium oksalat dengan larutan kalium permanganat 0,05 N sampai terbentuk sedikit warna merah muda;
- catat pemakaian larutan kalium permanganat yang diperlukan;
- lakukan hal yang sama terhadap air suling bebas nitrit yaitu langkah seperti cara diatas dengan mengganti larutan baku dengan air suling;
- bila pembakuan dilakukan dengan larutan fero-amonium-sulfat menggantikan natrium oksalat, maka tidak dilakukan pemanasan akan tetapi proses reaksi antara kalium permanganat dan fero amonium sulfat dibiarkan selama 5 menit sebelum dititrasi dengan kalium permanganat;
- perhitungan kadar nitrit dalam larutan induk adalah sebagai berikut:

$$\text{Kadar nitrit (NO}_2\text{) (mg/mL)} = \frac{\{(V_1 \times N_1) - (V_2 \times N_2)\} \times 7}{V_3}$$

Keterangan:

- V_1 adalah volume KMnO_4 yang digunakan, dinyatakan dalam mililiter (mL);
 N_1 adalah normalitas larutan KMnO_4 , dinyatakan dalam normal (N);
 V_2 adalah volume fero amonium sulfat atau natrium oksalat yang ditambahkan, dinyatakan dalam mililiter (mL);
 N_2 adalah normalitas larutan fero amonium sulfat atau natrium oksalat, dinyatakan dalam normal (N);
 V_3 adalah volume larutan baku NaNO_2 yang digunakan untuk titrasi, dinyatakan dalam mililiter (mL).

A.7.4.2 Pembuatan larutan standar baku nitrit, $\text{NO}_2\text{-N}$;

- Pipet larutan induk nitrit yang telah ditetapkan kadarnya ke dalam labu ukur 100 mL untuk memperoleh kadar nitrit sebesar 0,05 mg/L; 0,10 mg/L; 0,25 mg/L; dan 0,50 mg/L;
- tambahkan air suling bebas nitrit sampai tepat pada tanda tera;
- pipet 50 mL contoh dan masing-masing larutan standar ke dalam labu Erlenmeyer 100 mL;
- tambahkan 1 mL asam sulfanilat ke dalam larutan standar dan contoh. Biarkan larutan tersebut bereaksi selama 2 menit sampai dengan 8 menit;
- tambahkan 1 mL larutan naftil etilendiamin dihidroklorida, aduk dan biarkan paling sedikit 10 menit, tetapi tidak lebih dari 2 jam;
- masukkan ke dalam kuvet spektrofotometer dan ukur absorbannya pada panjang gelombang (λ) 543 nm; dan
- buat kurva kalibrasi dari hasil pengukuran absorban standar.

A.7.5 Perhitungan

Hitung kadar $\text{NO}_2\text{-N}$ dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

A.8 Amonia (sebagai NH_3)

A.8.1 Prinsip

Fenol alkali dan hipoklorit bereaksi dengan amonia membentuk biru indo fenol. Warna biru terbentuk secara cepat dengan natrium nitro prusida.

A.8.2 Peralatan

- Spektrofotometer yang mempunyai panjang gelombang 640 nm dan lebar celah kuvet 1,0 cm serta telah dikalibrasi;
- Oven terkalibrasi;
- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi;
- Labu ukur 25 mL, 100 mL dan 1 000 mL, terkalibrasi;
- Erlenmeyer 50 mL asah bertutup plastik; dan
- Pipet mikro ukuran 0,25 mL; 0,50 mL dan 1,00 mL, terkalibrasi.

A.8.3 Pereaksi

- Air suling bebas amonia; tambahkan 0,1 mL H_2SO_4 p.a ke dalam 1 L air suling, kemudian lakukan penyulingan kembali. Simpan dalam botol gelas dan tambahkan resin kation asam.
- Larutan fenol; campurkan 11,1 mL fenol cair ($\geq 89\%$) dengan etanol dan jadikan 100 mL. Peringatan : gunakan sarung tangan dan pelindung mata dan kerjakan di tempat yang ventilasinya baik (buat larutan yang baru setiap minggu).
- Larutan natrium nitro prusida 0,5 % b/v; larutkan 0,5 g natrium nitro prusida dalam 100 mL air suling, simpan dalam botol coklat.
- Larutan sitrat alkali; larutkan 200 g trisodium sitrat dan 10 g natrium hidroksida dalam air suling, jadikan 1 000 mL dengan air suling.
- Larutan natrium hipoklorit;
- Larutan pengoksidasi; campurkan 100 mL larutan sitrat alkali dengan 25 mL larutan natrium hipoklorid. Siapkan secara segar.
- Larutan baku ammonium; dan Larutkan 3,819 g NH_4Cl anhidrat (yang telah dikeringkan pada 100°C) dengan air suling dalam labu ukur 1 000 mL dan tepatkan sampai tanda tera. $1,00\text{ mL} = 1,00\text{ mg N} = 1,22\text{ mg NH}_3$.
- Larutan standar ammonium. Siapkan larutan kurva kalibrasi dari larutan baku amonia dalam kisaran konsentrasi amonia yang sesuai dengan contoh.

A.8.4 Cara kerja

- Hilangkan residu klorin dari contoh dengan menambahkan 3,5 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O/L}$ air. 1 mL reagent menghilangkan 1 mg/L residu klorin dalam 500 mL contoh;
- pipet 25 mL contoh dan 25 mL air suling bebas amonia sebagai blanko dan masukkan ke dalam Erlenmeyer 50 mL, tambahkan 1 mL larutan fenol, 1 mL larutan natrium nitro

- prusida, dan 2,5 mL larutan pengoksidasi, sambil dikocok untuk setiap penambahan masing-masing larutan.
- tutup contoh dengan tutup plastik biarkan sampai timbul warna pada suhu kamar (22 °C sampai dengan 27 °C) yang terlindung dari cahaya minimal 1 jam. Warna stabil dalam 24 jam.
 - ukur absorban larutan standar dan larutan contoh pada panjang gelombang 640 nm. Buat kurva kalibrasi dari pengukuran absorbansi standar.

A.8.5 Perhitungan

Hitung kadar nitrogen-amonia (N-NH₃) dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

A.9 Sulfat (SO₄) (Metode Spektrofotometri)

A.9.1 Prinsip

Ion sulfat akan diendapkan dalam media asam asetat dengan barium klorida (BaCl₂) membentuk kristal barium sulfat (BaSO₄). Absorben dari suspensi BaSO₄ diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm.

A.9.2 Peralatan

- Spektrofotometer sinar tunggal atau sinar ganda yang mempunyai kisaran panjang gelombang 190 nm sampai dengan 900 nm dan lebar celah 0,2 nm sampai dengan 2 nm, terkalibrasi;
- Labu ukur 200 mL dan 1 000 mL, terkalibrasi;
- Labu Erlenmeyer 125 ml dan 250 ml;
- Gelas piala 600 mL;
- Pengaduk magnet yang dilengkapi pengatur kecepatan putar tetap;
- Sendok takar untuk ukuran 0,2 mL hingga 0,3 mL; dan
- Pipet ukur 5 mL; 10 mL; 20 mL; 25 mL dan 50 mL, terkalibrasi.

A.9.3 Pereaksi

- Larutan bufer A;
larutkan 30 g magnesium klorida, MgCl₂.6H₂O; 5 g natrium asetat, CH₃COONa.3H₂O; 1,0 g kalium nitrat, KNO₃; dan 20 mL asam asetat, CH₃COOH (99%) dalam 500 mL air suling dan jadikan 1000 mL dengan air suling.
- Larutan bufer B (dipakai bila konsentrasi sulfat SO₄ dalam contoh kurang dari 10 mg/L);
larutkan 30 g MgCl₂.6H₂O; 5 g CH₃COONa.3H₂O; 1,0 g KNO₃; 0,111 g natrium sulfat, Na₂SO₄ dan 20 mL asam asetat (99%) dalam 500 mL air suling dan jadikan 1000 mL.
- Kristal barium klorida, BaCl₂. 2H₂O kristal 20 *mesh* sampai dengan 30 *mesh*;
- Larutan baku sulfat 100 mg/L ; dan
larutkan 0,1479 g Na₂SO₄ anhidrat dengan air suling dalam labu ukur 1000 mL dan tepatkan sampai tanda garis.
- Air suling yang mempunyai daya hantar listrik (DHL) 0,5µmhos/cm sampai dengan 2,0 µmhos/cm.

A.9.4 Cara kerja

- Ukur dengan teliti 100 mL contoh atau bagian yang dijadikan 100 mL ke dalam Erlenmeyer 250 mL;

- b) tambah 20 mL larutan bufer, aduk dengan alat pengaduk, sambil diaduk tambahkan 1 sendok spatula $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Mulai hitung waktu pengadukan selama 60 detik pada kecepatan tetap. Segera baca absorbansi pada spektrofotometer dalam waktu $5 \pm 0,5$ menit;
- c) siapkan kurva standar dengan konsentrasi 0 mg/L sampai dengan 40 mg/L dengan jarak standar 5 mg/L; dan
- d) koreksi untuk contoh berwarna dan keruh dengan menyiapkan blanko tanpa penambahan BaCl_2 .

A.9.5 Perhitungan

Jika dipakai larutan bufer A, tetapkan konsentrasi sulfat dalam contoh langsung dari kurva kalibrasi setelah absorban contoh setelah penambahan BaCl_2 dikurangi absorban contoh sebelum penambahan BaCl_2 . Jika dipakai larutan bufer B kurangi konsentrasi sulfat dalam contoh dengan konsentrasi sulfat dalam blanko .

A.10 Klorida (Cl^-) (Metode Titrasi)

A.10.1 Pinsip

Dalam larutan netral atau sedikit alkali, kalium kromat, K_2CrO_4 , dapat menunjukkan titik akhir pada penitaran klorida dengan perak nitrat, AgNO_3 . Perak klorida, AgCl , diendapkan seluruhnya sebelum terbentuk perak kromat, Ag_2CrO_4 yang berwarna kuning kemerah-merahan.

A.10.2 Peralatan

- a) Buret 50 mL berwarna coklat, terkalibrasi;
- b) Erlenmeyer 250 mL;
- c) Labu ukur 50 mL, 1000 mL terkalibrasi;
- d) Gelas ukur 100 mL; dan
- e) Pipet 100 mL terkalibrasi;

A.10.3 Pereaksi

- a) Indikator kalium kromat, K_2CrO_4 , 5%;
larutkan 50 g kalium kromat (K_2CrO_4) dalam sedikit air. Tambahkan larutan perak nitrat (AgNO_3) sampai terbentuk endapan merah. Biarkan 12 jam kemudian saring dan diencerkan dengan air suling menjadi 1 L.
- b) Larutan standar perak nitrat, AgNO_3 , 0,0141 N;
larutkan 2,395 g perak nitrat (AgNO_3) dalam air suling dan encerkan sampai volume 1000 mL. Standardisasi terhadap larutan NaCl 0,0141 N, 1,00 mL larutan AgNO_3 0,0141 N, setara dengan 0,500 mg Cl^- . Simpan larutan standar AgNO_3 dalam botol berwarna coklat.
- c) Larutan standar natrium klorida, NaCl 0,0141 N;
larutkan 824,0 mg NaCl yang sudah dikeringkan pada 140°C selama 1 jam, dalam air suling dan encerkan sampai 1000 mL. 1,00 mL NaCl setara dengan 0,500 mg Cl^- .
- d) Larutkan natrium hidroksida (NaOH) 1N; dan
larutkan 40 g NaOH dalam air suling dan encerkan sampai 1 L.
- e) Apabila ada pengganggu, digunakan pereaksi:
 - suspensi $\text{Al}(\text{OH})_3$ untuk menghilangkan warna yang ada pada contoh;
 - NaOH atau H_2SO_4 untuk mengkondisikan pH 4 sampai 7
 - H_2O_2 untuk menghilangkan sulfida, SO_2 dan S_2O_3

A.10.4 Cara kerja

- Ukur dengan teliti 100 mL contoh (V) yang mempunyai nilai pH 7 sampai dengan 10, apabila contoh tidak berada dalam kisaran pH tersebut, tambahkan H_2SO_4 N atau NaOH 1 N sehingga menjadi pH 7 sampai dengan pH 10;
- tambahkan 1 mL indikator K_2CrO_4 ;
- titrasi dengan larutan standar perak nitrat ($AgNO_3$) sampai timbul warna kuning kemerah-merahan (V_1);
- lakukan titrasi blanko dengan mengukur dengan teliti 100 mL air suling dan selanjutnya kerjakan sama dengan perlakuan contoh (V_2);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kadar klorida (Cl) dalam contoh.

A.10.5 Perhitungan

$$\text{Kadar } Cl^- (\text{mg/L}) = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 35450}{V}$$

Keterangan:

V_1 adalah volume $AgNO_3$ yang dipakai penitaran contoh, dinyatakan dalam mililiter (mL);

V_2 adalah volume $AgNO_3$ yang dipakai penitaran blanko, dinyatakan dalam mililiter (mL);

N adalah normalitas $AgNO_3$, dinyatakan dalam normal (N);

V adalah volume contoh, dinyatakan dalam mililiter (mL)

A.11 Fluorida (F^-) (Metode Spektrofotometri)**A.11.1 Prinsip**

Metode spektrofotometri SPADNS (sodium 2-parasulfofenylazo 20-1,8-dihidroxy-3,6-naftalene disulfanat) berdasarkan reaksi fluorida dan penyerapan warna zirkonium. Fluorida bereaksi dengan penyerapan warna zirkonium membentuk anion kompleks yang tidak berwarna ZrF_6^{2-} .

A.11.2 Peralatan

- Spektrofotometer sinar tunggal atau sinar ganda yang mempunyai kisaran panjang gelombang 190 nm sampai dengan 900 nm dan lebar celah 0,2 nm sampai dengan 2 nm serta telah dikalibrasi;
- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg, terkalibrasi;
- Labu Erlenmeyer asah 100 mL;
- Buret 25 mL, terkalibrasi;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1000 mL, terkalibrasi;
- Pipet 5 mL, 10 mL dan 50 mL terkalibrasi; dan
- Saringan membran berpori 0,45 μm .

A.11.3 Pereaksi

- Larutan baku fluorida 100 mg/L;
larutkan 221,0 mg natrium flourida anhidrat NaF dengan akuabides di dalam labu ukur 1000 mL dan encerkan dengan tepat tanda tera.

- b) Larutan standar fluorida 10 mg/L;
Pipet 10,00 mL larutan baku fluorida 100 mg/L, encerkan hingga 100,00 mL di dalam labu ukur.
- c) Larutan SPADNS;
Larutkan 958 mg SPADNS dalam 500 mL air suling. Larutan ini stabil selama 1 tahun jika disimpan di tempat gelap.
- d) Larutan asam zirkonil;
timbang 133 mg zirkonil klorida oktahidrat, $\text{ZrOC}_{12} \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ dan larutkan dalam 25 mL air suling. Tambahkan 350 mL HCl pekat dan encerkan dengan air suling sampai 500 mL;
- e) Larutan pereaksi campuran Zirkonil – SPADNS;
Campurkan dengan jumlah yang sama larutan asam zirkonil dan larutan SPADNS. Pereaksi campuran ini stabil selama 2 tahun.
- f) Larutan pembanding; dan
tambahkan 10 mL larutan SPADNS ke dalam 100 mL akuabides dan tambahkan 10 mL air suling yang mengandung 7 mL HCl pekat. Larutan ini digunakan agar spektrofotometer memberikan absorban dengan nilai nol (*setting instrument zero*) atau sama dengan blanko standar;
- g) Larutan natrium arsenit (NaAsO_2).
larutkan 5,0 g NaAsO_2 dengan akuabides dan encerkan hingga 1 000 mL.

A.11.4 Persiapan contoh

- a) Pipet 50 mL contoh uji secara duplo dan masukkan ke dalam labu Erlenmeyer 100 mL;
- b) apabila contoh uji keruh, saring contoh uji dengan saringan membran berpori 0,45 μm ;
- c) apabila contoh uji mengandung klorin tambahkan satu tetes larutan natrium arsenit, setiap contoh uji mengandung 0,1 mg/L klorin; dan
- d) contoh siap diuji.

A.11.5 Cara kerja

- a) Pembuatan kurva kalibrasi;
siapkan standar fluorida dengan kepekatan 0 mg/L sampai dengan 1,40 mg/L fluorida. Pipet 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL; 5,0 mL dan 6 mL larutan standar kemudian masukkan ke dalam labu 50 mL, tepatkan sampai tanda tera dengan akuabides dan kocok hingga homogen;
- b) pipet 50 mL contoh ke dalam Erlenmeyer asah 100 mL;
- c) tambahkan 5 mL larutan SPADNS dan 5 mL asam zirkonil klorida atau 10 mL larutan campuran SPADNS dan asam zirkonil klorida ke dalam masing-masing larutan standar dan contoh. Kocok hingga homogen;
- d) baca absorban larutan standar dan contoh pada alat spektrofotometer pada panjang gelombang 570 nm; dan
- e) buat kurva kalibrasi dari standar.

A.11.6 Perhitungan

Hitung kadar fluorida di dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

A.12 Sianida (CN^-) (Metode Spektrofotometri)

A.12.1 Prinsip

Sianida bebas diubah menjadi sianogen klorida (CNCl) dengan penambahan kloramin T pada pH kurang dari 8, dan direaksikan dengan pereaksi asam barbiturat-piridin sehingga

menghasilkan warna merah kebiru-biruan. Warna tersebut dibaca pada panjang gelombang 578 nm.

A.12.2 Peralatan

- Spektrofotometer pada panjang gelombang 578 nm, lebar celah kuvet 10 mm, terkalibrasi;
- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg, terkalibrasi;
- Penangas air ;
- pH meter terkalibrasi;
- Buret mikro 5 mL, skala terkecil 0,01 mL, terkalibrasi;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL, 250 mL, dan 1 000 mL, terkalibrasi;
- Corong pemisah 500 mL;
- Corong gelas;
- Gelas piala, 250 mL;
- Pinggan porselen;
- Pengaduk magnetik; dan
- Pipet 10 mL, 20 mL, 25 mL, 50 mL, dan 100 mL, terkalibrasi.

A.12.3 Pereaksi

- Larutan bufer fosfat 3 N;
larutkan 138 g natrium dihidrogen fosfat monohidrat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, dengan air suling dalam labu ukur 1 L dan tepatkan sampai tanda tera. Simpan dalam lemari pendingin.
- Larutan kloramin-T;
larutkan 1,0 g serbuk kloramin T dengan akuabides dalam labu ukur 100 mL, tepatkan volumenya, kocok dan simpan dalam lemari pendingin. Larutan stabil selama satu minggu.
- Larutan piridin-asam barbiturat;
timbang 15 g asam barbiturat kemudian masukkan dalam labu ukur 250 mL, larutkan dengan air suling dan tambahkan 75 mL piridin. Tambahkan 15 mL HCl pekat dan larutan diencerkan hingga volume 250 mL.
- Larutan NaOH 0,04 M;
larutkan 1,6 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 1 L, tepatkan volumenya hingga tanda tera dengan penambahan air suling.
- Indikator;
larutkan 20 mg *p-dimethyl aminobenzalrhodamina* dalam 100 mL aseton dalam gelas ukur 100 mL.
- Kristal NaCl;
- Larutan kalium khromat, K_2CrO_4 5%;
larutkan 12,5 g K_2CrO_4 dengan akuabides dalam gelas piala 250 mL. Tambahkan larutan AgNO_3 sampai terbentuk endapan merah nyata, biarkan 12 jam, saring, tepatkan volumenya sampai 1 L dengan akuabides.
- Larutan baku sianida; dan
larutkan 2,5 g KCN dan 1,6 g NaOH dengan air suling dalam labu 1 L, tepatkan sampai tanda tera, kemudian kocok. Simpan dalam botol coklat yang tertutup. Tetapkan kadarnya seminggu sekali;

Penetapan konsentrasi CN dari larutan standar:

- Pipet 10 mL larutan baku sianida (± 1000 mg/L) ke dalam Erlenmeyer (duplo) encerkan dengan larutan pengencer NaOH 0,04 M sampai volume ± 100 mL;
- untuk blanko gunakan larutan NaOH 0,04 M, tambahkan larutan indikator rodamina 1 mL, homogenkan;

- titar dengan larutan standar AgNO_3 sampai perubahan warna pertama dari kuning jernih menjadi coklat merah muda kekuning-kuningan, catat volume larutan standar AgNO_3 yang dipakai.

Perhitungan :

Konsentrasi CN dalam larutan baku dapat dihitung sebagai berikut:

$$\text{CN (mg / L)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \text{ AgNO}_3 \times 26 \times 1000}{V}$$

Keterangan:

V_1 adalah volume AgNO_3 untuk titrasi baku sianida, dinyatakan dalam mililiter (mL);

V_2 adalah volume AgNO_3 untuk titrasi blanko, dinyatakan dalam mililiter (mL);

V adalah volume larutan baku sianida yang dititar, dinyatakan dalam mililiter (mL);

N adalah normalitas larutan perak nitrat, AgNO_3 , dinyatakan dalam normal (N).

i) Larutan standar perak nitrat.

larutkan 3,27 g AgNO_3 dalam labu ukur 1 L dengan air suling, encerkan sampai tanda garis.

Tetapkan normalisasi sesuai dengan cara kerja sebagai berikut :

- timbang 0,8240 g NaCl (yang telah dikeringkan pada 140°C , selama 2 jam), masukkan ke dalam labu ukur 1000 mL, larutkan, encerkan dan tepatkan volumenya dengan akuabides sampai tanda tera (larutan NaCl ekuivalen dengan 0,0141 N);
- pipet 10 mL larutan di atas ke dalam Erlenmeyer (duplo), encerkan dengan akuabides hingga 100 mL, tambahkan 2 mL larutan indikator K_2CrO_4 5%, kocok, titar dengan larutan AgNO_3 sampai terjadi perubahan warna kecoklat-coklatan, catat volume AgNO_3 .

Perhitungan:

Normalitas larutan AgNO_3 dapat dihitung dengan rumus:

$$N \text{ AgNO}_3 = \frac{(V_1 \times N_1)}{V_2 - V_b}$$

Keterangan:

V_1 adalah volume larutan NaCl , dinyatakan dalam mililiter (mL);

N_1 adalah normalitas NaCl , dinyatakan dalam mililiter (mL);

V_2 adalah volume larutan AgNO_3 , dinyatakan dalam mililiter (mL);

V_b adalah volume larutan AgNO_3 untuk blanko, dinyatakan dalam mililiter (mL).

A.12.4 Cara kerja

- Pipet 20 mL contoh (V_1) ke dalam labu ukur 50 mL;
- buat larutan deret standar;
pipet 10 larutan baku sianida 1000 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL, encerkan dengan air suling hingga tanda garis (Larutan I). Pipet 10 mL larutan I ke dalam labu ukur 100 mL, encerkan dengan air suling hingga tanda garis (larutan II). Pipet 10 mL larutan II ke dalam labu ukur 100 mL, encerkan dengan akuabides hingga tanda garis (Larutan III ekuivalen dengan 1 mg CN^-/L).
- buat larutan standar sianida 0,02 sampai 0,12 mg/L.
pipet 1 mL; 2 mL; 3 mL; 4 mL; 5 mL; dan 6 mL larutan III ke dalam labu ukur 50 mL, encerkan dengan NaOH 0,04 M sampai volume larutan ± 35 mL.
- buat larutan blanko menggunakan 35 mL larutan NaOH 0,04 M;
- tambahkan 2 mL larutan kloramin T ke dalam contoh, larutan standar dan blanko kemudian aduk, dan segera tambahkan 5 mL larutan piridin asam barbiturat, aduk lagi

pelan-pelan. Encerkan dengan NaOH 0,04 M sampai tanda garis (V_2) dan kocok. Biarkan selama 8 menit, ukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 578 nm.

A.12.5 Perhitungan

Hitung kadar sianida dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier

$$\text{CN}^- (\text{mg/L}) = \frac{A \times V_2}{V_1}$$

Keterangan:

A adalah hasil pembacaan;

V_1 adalah volume contoh, dinyatakan dalam mililiter (mL);

V_2 adalah volume akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL).

A.13 Besi (Fe)

A.13.1 Metode Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) Tungku karbon

A.13.1.1 Prinsip

Analisis logam Fe dengan SSA menggunakan lampu katoda Fe berdasarkan penyerapan energi radiasi oleh atom-atom Fe pada tingkat energi dasar dengan atomisasi tungku karbon.

A.13.1.2 Peralatan

- SSA tungku karbon terkalibrasi;
- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi;
- Pemanas listrik;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1000 mL terkalibrasi;
- Gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- Tabung reaksi 20 mL;
- Pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi
- Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL terkalibrasi; dan
- Saringan membran 0,45 μm ;

A.13.1.3 Pereaksi

- Air suling bebas logam (akuabides);
Air suling yang telah mengalami 2 kali penyulingan;
- Asam nitrat HNO_3 p.a;
- Larutan induk besi 1000 mg/L;
- Larutan baku besi 10 mg/L; dan
pipet 1 mL larutan induk Fe 1000 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL, tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL / L) sampai tanda garis.
- Larutan standar Fe; 0 $\mu\text{g/L}$; 20 $\mu\text{g/L}$; 40 $\mu\text{g/L}$; 60 $\mu\text{g/L}$ dan 80 $\mu\text{g/L}$;
pipet masing-masing 0 mL; 0,20 mL; 0,40 mL; 0,60 mL; dan 0,80 mL larutan baku Fe 10 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL, tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

A.13.1.4 Cara kerja

- Saring larutan contoh 50 mL sampai 100 mL dengan menggunakan saringan membran 0,45 μm ;
- asamkan contoh sampai $\text{pH} < 2$ dengan HNO_3 p.a. ;
- bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL, tambahkan 5 mL HNO_3 p.a dan batu didih dan tutup dengan kaca arloji, kemudian uapkan di atas pemanas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL.
- pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- contoh siap diuji; dan
- periksa larutan standar dan contoh menggunakan SSA tungku karbon.

A.13.1.5 Perhitungan

Hitung kadar besi dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

A.13.2 Metode *Inductively Coupled Plasma* (ICP)**A.13.2.1 Prinsip**

Analisa logam Fe dengan ICP berdasarkan pada ionisasi persentasi yang tinggi dari atom yang dihasilkan oleh plasma bersuhu tinggi.

A.13.2.2 Peralatan

- ICP terkalibrasi;
- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi;
- Pemanas listrik;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1 000 mL terkalibrasi;
- Tabung reaksi 20 mL;
- Gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- Pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi;
- Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL terkalibrasi; dan
- Saringan membran 0,45 μm ;

A.13.2.3 Pereaksi

- Air suling bebas logam (akuabides);
Air suling yang telah mengalami 2 kali penyulingan.
- Asam nitrat HNO_3 p.a (*high purity*);
- Larutan induk besi 1 000 mg/L;
- Larutan baku besi 10 mg/L; dan
pipet 1 mL larutan induk Fe 1000 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL, tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- Larutan standar Fe; 0 mg; 0,15 mg/L; 0,30 mg/L; 0,45 mg/L dan 0,6 mg/L.
pipet masing-masing 0 mL; 1,5 mL; 3,0 mL; 4,5 mL; 6,00 mL larutan baku Fe 10 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

A.13.2.4 Cara kerja

- Saring larutan contoh 50 mL sampai 100 mL dengan menggunakan saringan membran 0,45 μm ;
- asamkan contoh sampai pH < 2 dengan HNO_3 p.a.;
- bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL tambahkan 5 mL HNO_3 p.a. dan batu didih dan tutup dengan kaca arloji, kemudian uapkan di atas pemanas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL.
- pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan air bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis;
- contoh siap diuji; dan
- periksa larutan standar dan contoh menggunakan ICP.

A.13.2.5 Perhitungan

Hitung kadar besi dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

A.14 Mangan**A.14.1 Metode SSA tungku karbon****A.14.1.1 Prinsip**

Analisis cemaran logam Mn dengan SSA menggunakan lampu katoda Mn berdasarkan penyerapan energi radiasi oleh atom-atom Mn pada tingkat energi dasar dengan atomisasi tungku karbon.

A.14.1.2 Peralatan

- SSA tungku karbon terkalibrasi;
- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi;
- Pemanas listrik;
- Tabung reaksi 20 mL;
- Gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1 000 mL terkalibrasi;
- Pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi;
- Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL terkalibrasi; dan
- Saringan membran 0,45 μm .

A.14.1.3 Pereaksi

- Air suling bebas logam (akuabides);
air suling yang telah mengalami 2 kali penyulingan.
- Asam nitrat HNO_3 p.a;
- Larutan induk mangan 1 000 mg/L;
- Larutan baku mangan 10 mg/L;
pipet 1 mL larutan induk Mn 1000 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambah akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- Larutan standar Mn ; 0 $\mu\text{g/L}$; 2,5 $\mu\text{g/L}$; 5,0 $\mu\text{g/L}$; 7,5 $\mu\text{g/L}$ dan 10 $\mu\text{g/L}$;
pipet masing-masing 0 mL; 0,25 mL; 0,50 mL; 0,75 mL; dan 1,0 mL larutan baku Mn 10 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

A.14.1.4 Cara kerja

- Saring larutan contoh 50 mL sampai 100 mL menggunakan saringan membran 0,45 μm ;
- asamkan contoh sampai $\text{pH} < 2$ dengan HNO_3 p.a;
- bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL tambahkan 5 mL HNO_3 pekat dan batu didih dan tutup dengan kaca arloji, kemudian uapkan di atas pemanas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL;
- pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan air bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai berimpit tanda garis;
- contoh siap diuji; dan
- periksa larutan standar dan contoh menggunakan SSA tungku karbon.

A.14.1.5 Perhitungan

Hitung kadar mangan dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

A.14.2 Metode ICP**A.14.2.1 Prinsip**

Analisa cemaran logam Mn dengan ICP berdasarkan pada ionisasi persentasi yang tinggi dari atom yang dihasilkan oleh plasma yang bersuhu tinggi.

A.14.2.2 Peralatan

- ICP terkalibrasi;
- Neraca dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi;
- Pemanas listrik;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1 000 mL terkalibrasi;
- Gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- Tabung reaksi 20 mL;
- Pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi;
- Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL terkalibrasi; dan
- Saringan membran 0,45 μm .

A.14.2.3 Pereaksi

- Air suling bebas logam (akuabides);
air suling yang telah mengalami 2 kali penyulingan.
- Asam nitrat HNO_3 p.a (*high purity*);
- Larutan induk mangan 1 000 mg/L;
- Larutan baku mangan 10 mg/L;
Pipet 1 mL larutan induk Mn 1000 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambah akuabides bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- Larutan standar Mn ; 0 $\mu\text{g/L}$; 50 $\mu\text{g/L}$; 100 $\mu\text{g/L}$; 150 $\mu\text{g/L}$ dan 200 $\mu\text{g/L}$;
Pipet masing-masing 0 mL; 1,25 mL; 2,50 mL; 3,75 mL; dan 5,0 mL larutan baku Mn 10 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan akuabides bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

A.14.2.4 Cara kerja

- Saring larutan contoh 50 mL sampai dengan 100 mL dengan menggunakan saringan membran 0,45 μm ;

- b) asamkan contoh sampai $\text{pH} < 2$ dengan HNO_3 p.a.;
- c) bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL tambahkan 5 mL HNO_3 p.a. dan batu didih dan tutup dengan kaca arloji, kemudian uapkan di atas pemanas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai dengan 20 mL;
- d) pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan air bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis;
- e) contoh siap diuji; dan
- f) periksa larutan standar dan contoh menggunakan ICP.

A.14.2.5 Perhitungan

Hitung kadar mangan dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier. Hasil pembacaan = kadar mangan (Mn)

A.15 Klor bebas (Cl_2) (metode spektrofotometri)

A.15.1 Prinsip

Bila N, N-diethyl-p-fenilendiamin (DPD) sebagai indikator dibubuhkan pada suatu larutan yang mengandung sisa klor aktif akan membentuk warna merah. Warna yang terjadi dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 515 nm.

A.15.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer dengan lebar celah 1,0 cm pada panjang gelombang 515 nm terkalibrasi;
- b) Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 500 mL terkalibrasi;
- c) Gelas piala 500 mL;
- d) Gelas ukur 100 mL;
- e) Botol kaca berwarna coklat; dan
- f) Pipet 50 mL terkalibrasi

A.15.3 Pereaksi

- a) Larutan bufer fosfat;
larutkan 24 g natrium hidrogen fosfat anhidrat (Na_2HPO_4) dan 46 gram Kalium dihidrogen fosfat, KH_2PO_4 , dengan air suling lebih kurang 250 mL. Tambahkan 100 mL akuabides yang mengandung 800 mg EDTA. Impitkan sampai 1 L dengan akuabides. Bubuhkan 20 mg HgCl_2 untuk mencegah tumbuhnya jamur.
- b) Larutan indikator DPD;
larutkan 0,5 g DPD oksalat atau 0,75 g DPD sulfat atau 0,55 g DPD sulfat anhidrat ke dalam labu ukur 500 mL yang berisi 200 mL akuabides yang mengandung 4 mL 1:3 H_2SO_4 dan 100 mg EDTA, kemudian encerkan sampai 500 mL dengan akuabides. Simpan dalam botol kaca berwarna coklat.
- c) Kristal kalium Iodida;
- d) Larutan kalium Iodida (KI);
larutkan 500 mg KI dan encerkan sampai 100 mL dengan akuabides dingin yang telah dididihkan, simpan dalam botol kaca yang berwarna coklat.
- e) Larutan natrium arsenit (NaAsO_2);
larutkan 5,0 g NaAsO_2 dengan akuabides dan impitkan sampai 1 L.
- f) Larutan tio asetamida (CH_3CSNH_2);
larutkan 250 mg CH_3CSNH_2 dengan 100 mL akuabides
- g) Air bebas klorin (*Clorin Demand freewater*);

tambahkan klorin secukupnya ke dalam air suling yang telah mengalami destilasi sempurna, sehingga memberikan konsentrasi klor bebas 5 mg/L. Setelah disimpan selama 2 hari larutan ini sekurang-kurangnya mengandung 2 mg/L klor bebas. Untuk menghilangkan klor bebas yang kelebihan maka larutan disimpan dalam wadah yang terkena sinar matahari atau terkena iradiasi sinar lampu ultra violet. Setelah beberapa jam tambahkan KI ke dalam larutan dan ukur total klorin dengan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 515 nm.

h) Larutan standar klorin; dan

Larutkan sejumlah standar klorin (berasal dari NaOCl_2) ke dalam sejumlah air suling, lalu standardisasi konsentrasi klorin dengan cara sebagai berikut:

Siapkan deret standar klorin dengan rentang 0,05 sampai 4 mg/L klorin dari larutan klorin 100 mg/L yang telah distandardisasi sebagai berikut :

- Masukkan 2 mL asam asetat pekat dan 10 mL sampai dengan 25 mL air bebas klorin kedalam Erlenmeyer, tambahkan 1 g KI.
- Ukur sejumlah volume larutan klorin, dimana 1 mL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,025 N akan ekuivalen dengan sekitar 0,9 mg klorin
- Kemudian titar larutan dengan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,025 N yang telah di standarisasi sampai warna kuning dari iodium hilang
- tambahkan 1 mL sampai dengan 2 mL indikator kanji, lanjutkan titrasi sampai warna biru hilang.
- Tetapkan blanko dengan menambahkan volume yang sama dari asam asetat, KI dan indikator kanji kedalam air bebas klorin dengan volume yang sama.
- Jika terbentuk warna biru titar dengan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,025 N sampai warna biru hilang,
- Catat hasil titrasi blanko dalam rumus negatif.
- Jika tidak terbentuk warna biru, titrasi dengan larutan iodium 0,0282 N sampai berwarna biru. Titrasi kembali dengan larutan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,025 N sampai warna biru hilang, catat perbedaan hasil titrasi blanko dalam rumus positif.

$$\text{MgCl sebagai Cl}_2/\text{mL} = \frac{(V_1 \pm V_2) \times N \times 35,45}{\text{mL larutan klorin}}$$

Keterangan:

V_1 adalah volume titrasi untuk klorin dinyatakan dalam mililiter (mL)

V_2 adalah volume titrasi untuk blanko (ditambahkan atau dikurangkan berdasarkan titrasi blanko yang disyaratkan diatas) dinyatakan dalam mililiter (mL)

N adalah normalitas dari $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Selain larutan NaOCl_2 sebagai standar bisa juga digunakan larutan KMnO_4

i) Larutan kalium permanganat

- Siapkan larutan induk yang mengandung 891 mg KMnO_4 dalam 1000 mL larutan.
- Encerkan 10,00 mL larutan induk menjadi 100 mL dengan air suling dalam labu ukur. Jika 1 mL larutan ini diencerkan menjadi 100 mL dengan air suling akan dihasilkan warna yang ekuivalen dengan 1 mg/L dalam reaksi DPD.
- Siapkan deret standar KMnO_4 yang sesuai dengan rentang yang ekuivalen dengan larutan buffer fosfat dan 5 mL pereaksi indikator DPD dalam erlenmeyer, tambahkan 100 mL standar KMnO_4 , kocok. Baca warna dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 515 nm. Sebagai pengecekan terhadap adanya absorpsi permanganat oleh air suling, kembalikan larutan dari dalam kuvet kedalam erlenmeyer dan segera titrasi dengan larutan standar FAS hingga warna merah hilang.

A.15.4 Cara kerja

- a) Kalibrasi spektrofotometer dengan larutan klorin pada panjang gelombang 515 nm;

- b) siapkan larutan standar klorin yang mempunyai konsentrasi 0,05 mg/L sampai dengan 4,0 mg/L;
- c) tempatkan masing-masing 0,5 mL larutan bufer fosfat dan 0,5 mL indikator DPD ke dalam tabung kuvet;
- d) tambahkan 10 mL contoh dan kocok;
- e) baca absorban pada 515 nm, dan buat kurva kalibrasi dari pembacaan deret standar.
- f) gunakan sejumlah contoh yang akan ditetapkan sesuai dengan kepekaan alat spektrofotometer;

Catatan :

Metode ini umumnya digunakan untuk ukuran kuvet 10 mL, untuk kuvet ukuran lain gunakan sejumlah volume contoh atau larutan standar dan pereaksi secara proporsional sesuai dengan ukuran kuvet pada alat spektrofotometer yang digunakan.

A.15.5 Pernyataan hasil

Hitung kadar klorin berdasarkan kurva kalibrasi.

A.16 Kromium (Cr)

A.16.1 Metode SSA tungku karbon

A.16.1.1 Prinsip

Analisis cemaran logam Cr dengan SSA menggunakan lampu katoda Cr berdasarkan penyerapan energi radiasi oleh atom-atom Cr pada tingkat energi dasar dengan atomisasi tungku karbon.

A.16.1.2 Peralatan

- a) SSA tungku karbon, terkalibrasi;
- b) Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi;
- c) Pemanas listrik;
- d) Tabung reaksi 20 mL;
- e) Gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- f) Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1 000 mL terkalibrasi;
- g) Pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi;
- h) Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL terkalibrasi; dan
- i) Saringan membran 0,45 µm.

A.16.1.3 Pereaksi

- a) Air suling bebas logam (akuabides);
Air suling yang telah mengalami dua kali penyulingan.
- b) Asam nitrat, HNO₃ p.a (*high purity*);
- c) Larutan induk Cr 1 000 mg/L;
- d) Larutan baku Cr 10 mg/L; dan
pipet 1 mL larutan induk Cr 1000 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan akuabides yang mengandung HNO₃ p.a. (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- e) Larutan standar Cr 0 µg; 10 µg; 20 µg; 30 µg dan 40 µg.
pipet masing-masing 0 mL; 0,1 mL; 0,20 mL; 0,3 mL; dan 0,4 mL larutan baku Cr 10 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan akuabides yang mengandung HNO₃ (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

A.16.1.4 Cara kerja

- Saring larutan contoh 50 mL sampai 100 mL menggunakan saringan membran 0,45 μm ;
- asamkan contoh sampai $\text{pH} < 2$ dengan HNO_3 p.a. ;
- bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL tambahkan 5 mL HNO_3 p.a, dan batu didih kemudian uapkan di atas pemanas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL;
- pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan air bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai berimpit tanda garis;
- contoh siap diuji; dan
- periksa larutan standar dan contoh menggunakan SSA tungku karbon.

A.16.1.5 Perhitungan

Hitung kadar Cr dalam contoh dengan menggunakan kurva standar atau persamaan garis regresi linier. Kadar Kromium (Cr) = Hasil Pembacaan.

A.16.2 Metode ICP**A.16.2.1 Prinsip**

Analisa cemaran logam Cr dengan ICP berdasarkan pada ionisasi presentasi yang tertinggi dari atom yang dihasilkan oleh plasma yang bersuhu tinggi.

A.16.2.2 Peralatan

- ICP terkalibrasi;
- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi;
- Penangas air;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1000 mL terkalibrasi;
- Gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- Pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi;
- Tabung reaksi 20 mL;
- Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL terkalibrasi; dan
- Saringan membran 0,45 μm ;

A.16.2.3 Pereaksi

- Air suling bebas logam (akuabides);
Air suling yang telah mengalami dua kali penyulingan.
- Asam nitrat, HNO_3 p.a (*high purity*);
- Larutan induk Cr 1 000 mg/L;
- Larutan baku Cr 10 mg/L;
pipet 1 mL larutan induk Cr 1000 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 p.a. (1,5 mL /L) sampai tanda garis.
- Larutan standar Cr 0 mg/L; 0,15 mg/L; 0,30 mg/L; 0,45 dan 0,60 mg/L.
pipet masing-masing 0 mL; 1,5 mL; 3,0 mL; 4,5mL; dan 6,0 mL larutan baku Cr 10 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 p.a. (1,5 mL/L) sampai tanda garis

A.16.2.4 Cara kerja

- Saring larutan contoh 50 mL sampai dengan 100 mL dengan menggunakan saringan membran 0,45 μm ;
- asamkan contoh sampai $\text{pH} < 2$ dengan HNO_3 p.a.;

- c) bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL, tambahkan 5 mL HNO_3 p.a. dan batu didih kemudian uapkan di atas pemanas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai dengan 20 mL;
- d) pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan air bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis;
- e) contoh siap diuji; dan
- f) periksa larutan standar dan contoh menggunakan ICP.

A.16.2.5 Perhitungan

Hitung kadar Cr dalam contoh dengan menggunakan kurva standar atau persamaan garis regresi linier. Kadar Kromium (Cr) = Hasil Pembacaan.

A.17 Barium (Ba)

A.17.1 Metode SSA tungku karbon

A.17.1.1 Prinsip

Analisis cemaran logam Ba dengan SSA berdasarkan penyerapan energi radiasi oleh atom Ba pada tingkat energi dasar dengan atomisasi tungku karbon.

A.17.1.2 Peralatan

- a) SSA tungku karbon, terkalibrasi;
- b) Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi;
- c) Pemanas listrik;
- d) Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1000 mL terkalibrasi;
- e) Gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- f) Tabung reaksi 20 mL;
- g) Pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi;
- h) Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL terkalibrasi; dan
- i) Saringan membran 0,45 μm ;

A.17.1.3 Pereaksi

- a) Air suling bebas logam (akuabides);
air suling yang telah mengalami dua kali penyulingan.
- b) Asam nitrat, HNO_3 p.a (*high purity*);;
- c) Larutan induk Ba 1000 mg/L;
- d) Larutan baku Ba 10 mg/L;
pipet larutan induk Ba, 1000 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- e) Larutan standar Ba 0 $\mu\text{g/L}$; 50 $\mu\text{g/L}$; 100 $\mu\text{g/L}$; 150 $\mu\text{g/L}$; 200 $\mu\text{g/L}$;
pipet masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; dan 1,5 mL larutan baku Ba 10 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

A.17.1.4 Persiapan contoh

- a) Saring larutan contoh 50 mL sampai 100 mL menggunakan saringan membran 0,45 μm ;
- b) asamkan contoh sampai pH < 2 dengan HNO_3 p.a. ;

- c) bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL, tambahkan 5 mL HNO_3 p.a. dan batu didih kemudian uapkan di atas pemanas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL;
- d) pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan air bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis;
- e) contoh siap diuji;
- f) periksa larutan standar dan contoh dengan menggunakan SSA tungku karbon.

A.17.1.5 Perhitungan

Hitung kadar barium dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier; hasil pembacaan = kadar barium (Ba).

A.17.2 Metode ICP

A.17.2.1 Prinsip

Analisa cemaran logam Ba dengan ICP berdasarkan pada ionisasi presentasi yang tertinggi dari atom yang dihasilkan oleh plasma yang bersuhu tinggi.

A.17.2.2 Peralatan

- a) ICP terkalibrasi;
- b) Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi;
- c) Penangas air;
- d) Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1 000 mL terkalibrasi;
- e) Gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- f) Pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi;
- g) Tabung reaksi 20 mL;
- h) Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL, dan 10 mL terkalibrasi; dan
- i) Saringan membran 0,45 μm ;

A.17.2.3 Pereaksi

- a) Air suling bebas logam (akuabides);
air suling yang telah mengalami dua kali penyulingan.
- a) Asam nitrat, HNO_3 p.a;
- b) Larutan Induk Ba 1 000 mg/L;
- c) Larutan baku Ba 10 mg/L; dan
Pipet larutan induk Ba, 1000 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan akuabides bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL /L) sampai tanda garis.
- d) Larutan standar Ba 0 $\mu\text{g/L}$; 50 $\mu\text{g/L}$; 100 $\mu\text{g/L}$; 150 $\mu\text{g/L}$; 200 $\mu\text{g/L}$.
Pipet masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; dan 1,5 mL larutan baku Ba 10 mg/l ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan akuabides bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

A.17.2.4 Persiapan contoh

- a) Saring larutan contoh 50 mL sampai dengan 100 mL dengan menggunakan saringan membran 0,45 μm ;
- b) asamkan contoh sampai pH < 2 dengan HNO_3 p.a.;
- c) bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL tambahkan 5 mL HNO_3 p.a. dan batu didih kemudian uapkan di atas pemanas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai dengan 20 mL;

- d) pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan air bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis;
- e) contoh siap diuji; dan
- f) periksa larutan standar dan contoh menggunakan ICP.

A.17.2.5 Perhitungan

Hitung kadar barium dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier. Hasil pembacaan = Kadar Barium (Ba)

A.18 Boron (B)

A.18.1 Metode Spektrofotometri (Metode karmin)

A.18.1.1 Prinsip

Keberadaan Boron dalam larutan karmin atau karminik dalam asam sulfat pekat akan mengubah warna dari merah terang ke merah kebiru-biruan atau biru tergantung pada jumlah boron.

A.18.1.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer dengan lebar celah 1,0 cm pada panjang gelombang 585 nm terkalibrasi;
- b) Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi;
- c) Oven terkalibrasi;
- d) Penangas air;
- e) Labu ukur 50 mL dan 1 000 mL terkalibrasi;
- f) Gelas piala 250 mL dan 500 mL;
- g) Tabung reaksi 30 mL;
- h) Mikroburet 1 mL sampai 10 mL terkalibrasi; dan
- i) Saringan membran 0,45 μm .

A.18.1.3 Pereaksi

- a) Air suling bebas logam (akuabides);
air suling yang telah mengalami dua kali penyulingan.
- b) Asam klorida, HCl p.a;
- c) Asam sulfat, H_2SO_4 p.a;
- d) Larutan karmin;
larutkan 920 mg karmin N.F.40 atau asam karminik dalam 1000 mL H_2SO_4 p.a.
- e) Larutan induk boron; dan
larutkan 571,6 mg asam borat anhidrat, H_3BO_3 , dalam 500 mL akuabides dan diencerkan tepat 1000 mL dengan akuabides bebas logam (1,00 mL = 100 μg B).
- f) Larutan standar boron 0 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 2,5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 7,5 $\mu\text{g/mL}$, dan 10 $\mu\text{g/mL}$.
pipet masing-masing 0 mL, 1 mL, 2,5 mL, 5 mL, 7,5 mL, dan 10 mL larutan induk B ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan akuabides yang mengandung HNO_3 p.a. (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

A.18.1.4 Persiapan contoh

- a) Pipet 2 mL setiap larutan standar dan contoh ke dalam masing-masing tabung reaksi 30 mL;

- b) tambahkan 2 tetes HCl p.a., 10 mL H₂SO₄ p.a. secara hati-hati ke dalam setiap larutan standar dan contoh, masing-masing dikocok dan biarkan mencapai suhu ruang;
- c) tambahkan 10 mL pereaksi karmin pada setiap perlakuan, kocok, dan biarkan 45 menit sampai 60 menit;
- d) contoh siap diuji; dan
- e) periksa absorben larutan standar dan contoh dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 585 nm.

A.18.1.5 Perhitungan

Hitung kadar boron (B) dalam contoh dengan menggunakan kurva standar atau persamaan garis regresi linier.

A.18.2 Metode ICP

A.18.2.1 Prinsip

Analisis cemaran logam boron (B) dengan ICP berdasarkan pada ionisasi persentasi yang tinggi dari atom yang dihasilkan oleh plasma yang bersuhu tinggi.

A.18.2.2 Peralatan

- a) ICP terkalibrasi;
- b) Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi;
- c) Penangas air;
- d) Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1 000 mL terkalibrasi;
- e) Gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- f) Pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi;
- g) Tabung reaksi 20 mL;
- h) Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL, dan 10 mL terkalibrasi; dan
- i) Saringan membran 0,45 µm;

A.18.2.3 Pereaksi

- a) Air suling bebas logam (akuabides);
air suling yang telah mengalami 2 kali penyulingan.
- b) Asam nitrat HNO₃ p.a (*high purity*);
- c) Larutan induk Boron 1000 mg/L;
- d) Larutan baku boron 10 mg/L;
pipet 1 mL larutan induk boron 1 000 mg/L ke dalam labu ukur 1000 mL tambahkan akuabides bebas logam yang mengandung HNO₃ (1,5 mL /L) sampai tanda garis.
- e) Larutan standar boron: 0 µg/L; 20 µg/L; 40 µg/L; 60 µg/L; dan 80 µg/L;
pipet masing-masing 0 mL; 0,20 mL; 0,40 mL; 0,60 mL dan 0,80 mL larutan baku Boron 10 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL, tambahkan akuabides bebas logam yang mengandung HNO₃ (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

A.18.2.4 Persiapan contoh

- a) Saring larutan contoh 50 mL sampai dengan 100 mL dengan menggunakan saringan membran 0,45 µm;
- b) asamkan contoh sampai pH < 2 dengan HNO₃ p.a.;
- c) bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL tambahkan 5 mL HNO₃ p.a. dan batu didih kemudian uapkan di atas pemanas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai dengan 20 mL;

- d) pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis;
- e) contoh siap diuji; dan
- f) periksa larutan standar dan contoh menggunakan ICP.

A.18.2.5 Perhitungan

Hitung kadar boron dalam contoh dengan menggunakan kurva standar atau persamaan garis regresi linier.

A.19 Selenium (Se)

A.19.1 Metode SSA Tungku Karbon

A.19.1.1 Prinsip

Analisis cemaran logam Se dengan SSA menggunakan lampu katoda Se berdasarkan penyerapan energi radiasi oleh atom-atom Se pada tingkat energi dasar dengan atomisasi tungku karbon.

A.19.1.2 Peralatan

- a) SSA tungku karbon terkalibrasi;
- b) Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi;
- c) Pemanas listrik;
- d) Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1000 mL terkalibrasi;
- e) Tabung reaksi 20 mL;
- f) Gelas piipa 150 mL dan 500 mL;
- g) Pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi
- h) Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL terkalibrasi; dan
- i) Saringan membran 0,45 μm .

A.19.1.3 Pereaksi

- a) Air suling bebas logam (akuabides);
air suling yang telah mengalami 2 kali penyulingan.
- b) Asam nitrat HNO_3 p.a (*high purity*);
- c) Larutan induk Se 1000 mg/L;
- d) Larutan baku Se 10 mg/L; dan
pipet 1 mL larutan baku Se 1000 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL, tambah akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- e) Larutan standar Se: 0 $\mu\text{g/L}$; 25 $\mu\text{g/L}$; 50 $\mu\text{g/L}$; 75 $\mu\text{g/L}$; dan 100 $\mu\text{g/L}$;
pipet masing-masing 0 mL; 0,25 mL; 0,50 mL; 0,75 mL; dan 1,00 mL larutan baku Se 10 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

A.19.1.4 Persiapan contoh

- a) Saring larutan contoh 50 mL sampai dengan 100 mL dengan menggunakan saringan membran 0,45 μm ;
- b) asamkan contoh sampai $\text{pH} < 2$ dengan HNO_3 p.a. ;
- c) bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL, tambahkan 5 mL HNO_3 p.a. dan batu didih kemudian uapkan di atas pemanas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai dengan 20 mL;

- d) pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan air bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis; dan
- e) contoh siap diuji.

A.19.1.5 Cara kerja

Periksa larutan standar dan contoh dengan menggunakan SSA tungku karbon.

A.19.1.6 Perhitungan

Hitung kadar Se dalam contoh dengan menggunakan kurva standar atau persamaan garis regresi linier. Kadar Selenium (Se) = Hasil Pembacaan.

A.19.2 Metode SSA natrium borohidrid

A.19.2.1 Prinsip

Analisis cemaran logam Se dengan SSA menggunakan lampu katoda Se berdasarkan penyerapan energi radiasi oleh atom-atom Se pada tingkat energi dasar dengan atomisasi uap hidrid.

A.19.2.2 Peralatan

- a) SSA dan generator uap hidrid terkalibrasi;
- b) Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi;
- c) Pemanas listrik;
- d) Tabung reaksi 20 mL;
- e) Gelas piipa 150 mL dan 500 mL;
- f) Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1000 mL terkalibrasi;
- g) Pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi;
- h) Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL terkalibrasi; dan
- i) Saringan membran 0,45 μm .

A.19.2.3 Pereaksi

- a) Air suling bebas logam (akuabides);
air suling yang telah mengalami 2 kali penyulingan.
- b) Asam nitrat HNO_3 p.a (*high purity*);
- c) Larutan induk Se 1000 mg/L;
- d) Larutan baku Se 10 mg/L; dan
pipet 1 mL larutan baku Se 1000 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL, tambah akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL /L) sampai tanda garis.
- e) Larutan Standar Se: 0 $\mu\text{g/L}$; 25 $\mu\text{g/L}$; 50 $\mu\text{g/L}$; 75 $\mu\text{g/L}$; dan 100 $\mu\text{g/L}$;
pipet masing-masing 0 mL; 0,25 mL; 0,50 mL; 0,75 mL; dan 1,00 mL larutan baku Se 10 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

A.19.2.4 Persiapan contoh

- a) Saring larutan contoh 50 mL sampai dengan 100 mL dengan menggunakan saringan membran 0,45 μm ;
- b) asamkan contoh sampai pH < 2 dengan HNO_3 p.a.;
- c) bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL tambahkan 5 mL HNO_3 p.a. dan batu didih kemudian uapkan di atas pemanas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL;

- d) pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan air bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis; dan
- e) contoh siap diuji.

A.19.2.5 Cara kerja

Periksa larutan standar dan contoh menggunakan spektrofotometer serapan atom generator uap hidrid.

A.19.2.6 Perhitungan

Hitung kadar Se dalam contoh dengan menggunakan kurva standar atau persamaan garis regresi linier.

A.20 Timbal (Pb) (Metode SAA Tungku Karbon)

A.20.1 Prinsip

Analisis cemaran logam Pb dengan SSA menggunakan lampu katoda Pb berdasarkan pada penyerapan energi radiasi oleh atom-atom Pb pada tingkat energi dasar dengan atomisasi tungku karbon.

A.20.2 Peralatan

- a) SSA tungku karbon terkalibrasi;
- b) Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi;
- c) Pemanas listrik;
- d) Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1000 mL terkalibrasi;
- e) Tabung reaksi 20 mL;
- f) Gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- g) Pipet ukur 10 dan 100 ml terkalibrasi
- h) Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL terkalibrasi; dan
- i) Saringan membran 0,45 μm .

A.20.3 Pereaksi

- a) Air suling bebas logam (akuabides);
Air suling yang telah mengalami dua kali penyulingan.
- b) Asam nitrat, HNO_3 p.a (*high purity*);
- c) Larutan induk Pb 1000 mg /L;
- d) Larutan baku Pb 10 mg/L;
pipet 1 mL larutan baku Pb 1000 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambah akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- e) Larutan Standar Pb; 0 $\mu\text{g/L}$; 10 $\mu\text{g/L}$; 40 $\mu\text{g/L}$ dan 80 $\mu\text{g/L}$;
pipet masing-masing 0 mL; 0,10 mL; 0,20 mL; 0,40 mL dan 0,80 mL larutan baku Pb 10 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

A.20.4 Persiapan contoh

- a) Saring larutan contoh 50 mL sampai dengan 100 mL dengan menggunakan saringan membran 0,45 μm ;
- b) asamkan contoh sampai pH < 2 dengan HNO_3 p.a.;

- c) bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL, tambahkan 5 mL HNO_3 p.a. dan batu didih kemudian uapkan di atas pemanas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL;
- d) pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan akuabides (air dengan konduktivitas $< 0,2 \mu\text{S/cm}$) yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis; dan
- e) contoh siap diuji.

A.20.5 Cara kerja

Periksa larutan standar dan contoh dengan menggunakan SSA tungku karbon.

A.20.6 Perhitungan

Hitung kadar Pb dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

A.21 Kadmium (Cd) (Metode SSA Tungku Karbon)

A.21.1 Prinsip

Analisis cemaran logam kadmium (Cd) dengan SSA menggunakan lampu katoda Cd berdasarkan pada penyerapan energi radiasi oleh atom-atom yang berbeda-beda pada tingkat tenaga dasar.

A.21.2 Peralatan

- a) SSA tungku karbon terkalibrasi;
- b) Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi
- c) Pemanas listrik;
- d) Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1000 mL terkalibrasi;
- e) Tabung reaksi 20 mL;
- f) Gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- g) Pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi
- h) Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL terkalibrasi; dan
- i) Saringan membran 0,45 μm .

A.21.3 Pereaksi

- a) Air suling bebas logam;
air suling yang telah mengalami dua kali penyulingan.
- b) Asam nitrat, HNO_3 p.a;
- c) Larutan induk Cd 1000 mg /L;
- d) Larutan baku Cd 1 mg/L;
pipet 1 mL larutan baku Cd 1000 mL/L kedalam labu ukur 1000 mL, tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- e) Larutan standar Cd; 0 $\mu\text{g/L}$; 2,5 $\mu\text{g/L}$; 5 $\mu\text{g/L}$; 7,5 $\mu\text{g/L}$ dan 10 $\mu\text{g/L}$;
pipet masing-masing 0 mL; 0,25 mL; 0,5 mL; 0,75 mL dan 1 mL larutan baku Cd 1 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

A.21.4 Persiapan contoh

- Saring larutan contoh 50 mL sampai dengan 100 mL dengan menggunakan saringan membran 0,45 μm ;
- asamkan contoh sampai pH < 2 dengan HNO_3 p.a.;
- bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL, tambahkan 5 mL HNO_3 p.a. dan batu didih kemudian uapkan di atas pemanas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL;
- pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis; dan
- contoh siap diuji.

A.21.5 Cara kerja

Periksa larutan standar dan contoh menggunakan SSA tungku karbon.

A.21.6 Perhitungan

Hitung kadar Cd dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

A.22 Tembaga (Cu)

A.22.1 Metode SAA tungku karbon

A.22.1.1 Prinsip

Analisis cemaran logam Cu dengan SSA menggunakan lampu katoda Cu berdasarkan pada penyerapan energi radiasi oleh atom-atom Cu pada tingkat energi dasar dengan atomisasi tungku karbon.

A.22.1.2 Peralatan

- SSA tungku karbon terkalibrasi;
- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi
- Pemanas listrik;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1000 mL terkalibrasi;
- Tabung reaksi 20 mL;
- Gelas piala 150 mL dan 500 mL
- Pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi
- Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL terkalibrasi; dan
- Saringan membran 0,45 μm .

A.22.1.3 Pereaksi

- Air suling bebas logam (akuabides);
Air suling yang telah mengalami dua kali penyulingan.
- Asam nitrat, HNO_3 p.a (*high purity*);
- Larutan induk Cu 1000 mg/L;
- Larutan baku Cu 1 mg/L;
pipet 1 mL larutan standar Cu 1000 mL/L ke dalam labu ukur 1000 mL tambah akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- Larutan standar Cu; 0 $\mu\text{g/L}$; 5 $\mu\text{g/L}$; 10 $\mu\text{g/L}$; 15 $\mu\text{g/L}$ dan 20 $\mu\text{g/L}$;

pipet masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL dan 2 mL larutan baku Cu 1 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan akuabides yang mengandung HNO₃ (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

A.22.1.4 Persiapan contoh

- Saring larutan contoh 50 mL sampai dengan 100 mL dengan menggunakan saringan membran 0,45 µm;
- asamkan contoh sampai pH < 2 dengan HNO₃ p.a.;
- bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL, tambahkan 5 mL HNO₃ p.a. dan batu didih kemudian uapkan di atas pemanas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL;
- pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan akuabides yang mengandung HNO₃ (1,5 mL/L) sampai tanda garis; dan
- contoh siap diuji.

A.22.1.5 Cara kerja

Periksa larutan standar dan contoh dengan menggunakan SSA tungku karbon.

A.22.1.6 Perhitungan

Hitung kadar tembaga dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

A.22.2 Metode ICP

A.22.2.1 Prinsip

Analisis cemaran logam Cu dengan ICP berdasarkan pada ionisasi persentasi yang tinggi dari atom yang dihasilkan oleh plasma bersuhu tinggi.

A.22.2.2 Peralatan

- ICP terkalibrasi;
- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi;
- Penangas air;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1000 mL terkalibrasi;
- Gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- Pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi;
- Tabung reaksi 20 mL;
- Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL, dan 10 mL terkalibrasi; dan
- Saringan membran 0,45 µm;

A.22.2.3 Pereaksi

- Air suling bebas logam (akuabides);
air suling yang telah mengalami dua kali penyulingan.
- Asam nitrat, HNO₃ p.a.;
- Larutan induk Cu 1000 mg/L;
- Larutan baku Cu 1 mg/L;
pipet 1 mL larutan standar Cu 1000 mL/L ke dalam labu ukur 1000 mL tambah akuabides yang mengandung HNO₃ (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- Larutan standar Cu; 0 µg/L; 50 µg/L; 100 µg/L ; 150 µg/L dan 200 µg/L ;

pipet masing-masing 0 mL; 5 mL; 10 mL; 15 mL dan 20 mL larutan baku Cu 1 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL, dan tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

A.22.2.4 Persiapan contoh

- Saring larutan contoh 50 mL sampai dengan 100 mL dengan menggunakan saringan membran 0,45 μm ;
- asamkan contoh sampai $\text{pH} < 2$ dengan HNO_3 p.a.;
- bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL tambahkan 5 mL HNO_3 p.a. dan batu didih kemudian uapkan di atas pemanas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL;
- pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis; dan
- contoh siap diuji.

A.22.2.5 Cara kerja

Periksa larutan standar dan contoh dengan menggunakan ICP.

A.22.2.6 Perhitungan

Hitung kadar tembaga (Cu) dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

A.23 Merkuri (Hg) (Metode SSA Secara Uap Dingin)

A.23.1 Prinsip

Analisis logam Hg dengan SSA secara uap dingin menggunakan lampu katoda Hg berdasarkan pada penyerapan energi radiasi oleh asam-asam yang berbeda-beda pada tingkat dasar.

A.23.2 Peralatan

- SSA dengan sistem uap dingin (*cold vapour*);
- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi;
- Pemanas listrik;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1000 mL terkalibrasi;
- Tabung reaksi 20 mL;
- Gelas piala 150 mL dan 500 mL
- Pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi
- Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL terkalibrasi; dan
- Saringan membran 0,45 μm .

A.23.3 Pereaksi

- Air suling bebas logam (akuabides);
Air suling yang telah mengalami dua kali penyulingan.
- Asam nitrat HNO_3 p.a (*high purity*);
- Asam sulfat H_2SO_4 p.a;
- Larutan kalium permanganat, KMnO_4 , 5 %;
larutkan 50 g KMnO_4 dalam labu ukur 1 L dengan akuabides, encerkan dan impitkan sampai tanda garis.

- e) Larutan kalium persulfat, $K_2S_2O_8$, 5 %;
larutkan 50 g $K_2S_2O_8$ dalam labu ukur 1 L dengan akuabides, encerkan dan impitkan sampai tanda garis.
- f) Larutan Natrium klorida hidroksil-amin sulfat, $(NH_2OH)_2.H_2SO_4$.
larutkan 120 g NaCl dan 120 g $(NH_2OH)_2.H_2SO_4$ dalam labu ukur 1 L dengan akuabides, encerkan sampai tanda garis.
- g) Larutan $SnCl_2$;
larutkan 10 g $SnCl_2$ ke dalam 100 mL air suling yang sudah mengandung HCl 20% v/v.
- h) Larutan induk Hg 1000 mg/L;
- i) Larutan baku Hg 1 mg/L;
pipet 1 mL larutan induk Hg 1000 mg/L ke dalam labu ukur 1000 mL tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- j) Larutan standar Hg. 0 $\mu g/L$; 1 $\mu g/L$; 2 $\mu g/L$; 3 $\mu g/L$; 4 $\mu g/L$ dan 5 $\mu g/L$;
pipet masing-masing 0 mL; 0,1 mL; 0,2 mL; 0,3 mL; 0,4 mL; dan 0,5 mL larutan baku Hg 1 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis. Larutan standar harus selalu segar.

A.23.4 Cara kerja

- a) Ukur dengan teliti 100 mL contoh dan akuabides sebagai blanko ke dalam labu Erlenmeyer 250 mL;
- b) tambahkan 5 mL H_2SO_4 pa, 2,5 mL HNO_3 dan 15 mL larutan $KMnO_4$, ke dalam contoh larutan standar dan blanko, biarkan paling sedikit 15 menit;
- c) tambah 8 mL larutan $K_2S_2O_8$ dan panaskan selama 2 jam dalam penangas air pada suhu 95 °C;
- d) dinginkan pada suhu ruang dan tambah 6 mL larutan $(NH_2OH)_2.H_2SO_4$ untuk mengurangi kelebihan permanganat;
- e) periksa larutan standar dan contoh dengan menggunakan SSA uap dingin.

A.23.5 Perhitungan

Hitung kadar merkuri dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

A.24 Alumunium (Al)

A.24.1 Metode SAA tungku karbon

A.24.1.1 Prinsip

Analisis cemaran logam Al dengan SSA menggunakan lampu katoda Al berdasarkan pada penyerapan energi radiasi oleh atom-atom Al pada tingkat energi dasar dengan atomisasi tungku karbon.

A.24.1.2 Peralatan

- a) SSA tungku karbon terkalibrasi;
- b) Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi
- c) Pemanas listrik;
- d) Labu ukur 50 mL , 100 mL dan 1000 mL terkalibrasi;
- e) Tabung reaksi 20 mL;
- f) Gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- g) Pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi;
- h) Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL terkalibrasi; dan

- i) Saringan membran 0,45 μm .

A.24.1.3 Pereaksi

- a) Air suling bebas logam (akuabides);
Air suling yang telah mengalami dua kali penyulingan.
- b) Asam nitrat, HNO_3 p.a (*high purity*);
- c) Larutan induk Al 1000 mg/L;
- d) Larutan baku Al 1 mg/L;
pipet 1 mL larutan standar Al 1000 mL/L ke dalam labu ukur 1000 mL tambah akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- e) Larutan standar Al; 0 $\mu\text{g/L}$; 5 $\mu\text{g/L}$; 10 $\mu\text{g/L}$; 15 $\mu\text{g/L}$ dan 20 $\mu\text{g/L}$;
pipet masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL dan 2 mL larutan baku Al 1 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

A.24.1.4 Persiapan contoh

- a) Saring larutan contoh 50 mL sampai dengan 100 mL dengan menggunakan saringan membran 0,45 μm ;
- b) asamkan contoh sampai $\text{pH} < 2$ dengan HNO_3 p.a.;
- c) bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL, tambahkan 5 mL HNO_3 p.a. dan batu didih kemudian uapkan di atas pemanas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL;
- d) pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan air bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis; dan
- e) contoh siap diuji.

A.24.1.5 Cara kerja

Periksa larutan standar dan contoh dengan menggunakan SSA tungku karbon.

A.24.1.6 Perhitungan

Hitung kadar tembaga dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

A.24.2 Metode ICP

A.24.2.1 Prinsip

Analisis cemaran logam Al dengan ICP berdasarkan pada ionisasi persentasi yang tinggi dari atom yang dihasilkan oleh plasma bersuhu tinggi.

A.24.2.2 Peralatan

- a) ICP terkalibrasi;
- b) Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi;
- c) Penangas air;
- d) Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1000 mL terkalibrasi;
- e) Gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- f) Pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi;
- g) Tabung reaksi 20 mL;
- h) Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL, dan 10 mL terkalibrasi; dan
- i) Saringan membran 0,45 μm ;

A.24.2.3 Pereaksi

- a) Air suling bebas logam (akuabides);
air suling yang telah mengalami dua kali penyulingan.
- b) Asam nitrat, HNO_3 p.a (*high purity*);
- c) Larutan induk Al 1000 mg/L;
- d) Larutan baku Al 1 mg/L;
pipet 1 mL larutan standar Al 1000 mL/L ke dalam labu ukur 1000 mL tambah akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- e) Larutan standar Al; 0 $\mu\text{g/L}$; 50 $\mu\text{g/L}$; 100 $\mu\text{g/L}$; 150 $\mu\text{g/L}$ dan 200 $\mu\text{g/L}$;
pipet masing-masing 0 mL; 5 mL; 10 mL; 15 mL dan 20 mL larutan baku Al 1 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL dan tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

A.24.2.4 Persiapan contoh

- a) Saring larutan contoh 50 mL sampai dengan 100 mL dengan menggunakan saringan membran 0,45 μm ;
- b) asamkan contoh sampai pH < 2 dengan HNO_3 p.a.;
- c) bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL, tambahkan 5 mL HNO_3 p.a. dan batu didih kemudian uapkan di atas pemanas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL;
- d) pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis; dan
- e) contoh siap diuji.

A.24.2.5 Cara kerja

Periksa larutan standar dan contoh dengan menggunakan ICP.

A.24.2.6 Perhitungan

Hitung kadar Aluminium (Al) dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

A.25 Arsen (As)**A.25.1 Metode SSA tungku karbon****A.25.1.1 Prinsip**

Analisis As dengan SSA menggunakan lampu katoda As berdasarkan pada penyerapan energi radiasi oleh asam-asam yang berbeda-beda pada tingkat dasar.

A.25.1.2 Peralatan

- a) SSA tungku karbon terkalibrasi;
- b) Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi;
- c) Pemanas listrik;
- d) Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1000 mL terkalibrasi;
- e) Tabung reaksi 20 mL;
- f) Gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- g) Pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi
- h) Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL terkalibrasi; dan

- i) Saringan membran 0,45 μm .

A.25.1.3 Pereaksi

- Air suling bebas logam (akuabides);
air suling yang telah mengalami 2 kali penyulingan.
- Asam nitrat, HNO_3 p.a;
- Larutan induk arsen 1000 mg/L;
- Larutan baku arsen 1 mg/L;
pipet 1 mL larutan baku arsen 1000 mg/L ke dalam labu ukur 1000 mL tambahkan 5 mL HNO_3 p.a. dan encerkan dengan akuabides sampai tanda garis.
- Larutan standar arsen 2,5 $\mu\text{g/L}$; 5 $\mu\text{g/L}$; 7,5 $\mu\text{g/L}$; dan 10 $\mu\text{g/L}$;
pipet masing-masing 0 mL; 0,25 mL; 0,50 mL; 0,75 mL dan 1,00 mL larutan baku arsen 1 mg/L kedalam labu ukur 100 mL tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

A.25.1.4 Persiapan contoh

- Saring larutan contoh 50 mL sampai dengan 100 mL dengan menggunakan saringan membran 0,45 μm ;
- asamkan contoh sampai pH < 2 dengan HNO_3 p.a.;
- bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL, tambahkan 5 mL HNO_3 p.a. dan batu didih kemudian uapkan di atas pemanas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL;
- pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis; dan
- contoh siap diuji.

A.25.1.5 Cara kerja

Periksa larutan standar dan contoh dengan menggunakan SSA tungku karbon.

A.25.1.6 Perhitungan

Hitung kadar cemaran As dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

A.25.2 Metode SSA secara natrium borohidrid

A.25.2.1 Prinsip

Analisis As dengan SSA menggunakan lampu katoda As berdasarkan pada penyerapan energi radiasi oleh atom-atom yang berbeda-beda pada tingkat dasar.

A.25.2.2 Peralatan

- SSA dengan sistem *hydride generation* terkalibrasi;
- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi;
- Pemanas listrik;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1000 mL terkalibrasi;
- Tabung reaksi 20 mL;
- Gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- Pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi;
- Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL terkalibrasi; dan
- Saringan membran 0,45 μm .

A.25.2.3 Pereaksi

- Air suling bebas logam (akuabides) ;
air suling yang telah mengalami 2 kali penyulingan.
- Asam nitrat, HNO_3 p.a;
- Larutan natrium borohidrida, NaBH_4 ;
larutkan 8 g NaBH_4 dengan 200 mL NaOH 0,1 N, larutan ini harus segar.
- Larutan induk arsen 1000 mg/L;
- Larutan baku arsen 1 mg/L; dan
pipet 1 mL larutan baku arsen 1000 mg/L ke dalam labu ukur 1000 mL tambahkan 5 mL HNO_3 p.a. dan encerkan dengan akuabides sampai tanda garis.
- Larutan standar arsen 2,5 $\mu\text{g/L}$; 5 $\mu\text{g/L}$; 7,5 $\mu\text{g/L}$; dan 10 $\mu\text{g/L}$.
pipet masing-masing 0 mL; 0,25 mL; 0,50 mL; 0,75 mL dan 1,00 mL larutan baku arsen 1 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL, tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

A.25.2.4 Persiapan contoh

- Saring larutan contoh 50 mL sampai dengan 100 mL dengan menggunakan saringan membran 0,45 μm ;
- asamkan contoh sampai $\text{pH} < 2$ dengan HNO_3 p.a.;
- bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL tambahkan 5 mL HNO_3 p.a. dan batu didih kemudian uapkan di atas pemanas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL;
- pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan akuabides yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis; dan
- contoh siap diuji.

A.25.2.5 Cara kerja

Periksa larutan standar dan contoh dengan menggunakan SSA generator uap hidrid.

A.25.2.6 Perhitungan

Hitung kadar cemaran As dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

A.26 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka lempeng total, bakteri *Coliform*, dan *Escherichia coli***A.26.1 Prinsip**

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk menggiatkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

A.26.2 Peralatan

- Alat homogenisasi (blender) dengan kecepatan 10 000 rpm sampai dengan 12 000 rpm;
- Otoklaf;
- Pemanas listrik;
- Neraca kapasitas 2 000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;

- e) Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- f) Gelas piala steril;
- g) Labu Erlenmeyer steril;
- h) Botol pengencer steril;
- i) Pipet volumetrik steril 10,0 mL dan 1,0 mL terkalibrasi, dilengkapi dengan *bulb* atau *pipettors*;
- j) Tabung reaksi; dan
- k) Sendok, gunting dan spatula steril.

A.26.3 Larutan pengencer

Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB);

- KH_2PO_4 34 g
- aqua bides 500 mL

Larutkan bahan-bahan di atas dan atur pH dengan NaOH sehingga mencapai pH 7,2, tepatkan volume sampai 1 000 mL dengan akuabides. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit, simpan pada refrigerator. Untuk membuat larutan pengencer, 1,25 mL larutan stok diencerkan dengan air suling sampai volume 1 000 mL. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam botol pengencer sebanyak 450 mL dan ke dalam tabung reaksi sebanyak 9 mL dan disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.26.4 Homogenisasi contoh

- a) Pipet 50 mL contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pengencer steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- b) kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.27 Angka lempeng total (35 °C, 48 jam)

A.27.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 48 jam pada suhu (35 ± 1) °C.

A.27.2 Peralatan

- a) Inkubator (35 ± 1) °C terkalibrasi;
- b) Oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- c) Otoklaf;
- d) Penangas air bersirkulasi (45 ± 1) °C;
- e) Alat penghitung koloni;
- f) *Tally register*;
- g) Pipet ukur 10 mL steril dilengkapi *bulb* atau *pipettor*;
- h) Cawan petri gelas/plastik steril (berdiameter 50 mm sampai dengan 60 mm);
- i) Saringan membran 0,45 µm; dan
- j) Gelas ukur 100 mL.

A.27.3 Pembenihan dan pengenceran

Plate count agar (PCA)

- *tryptone* 5 g
- *yeast extract* 2,5 g
- glukosa 1 g

- agar 15 g
- air suling 1 000 mL

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.27.4 Cara kerja

- a) Pasang peralatan penyaring membran yang terdiri dari corong, membran penyaring dan penampung yang telah disterilkan lebih dahulu dan hubungkan dengan vakum sistem;
- b) masukkan 100 mL contoh atau sejumlah yang diperlukan ke dalam corong dari alat penyaring dengan menggunakan pipet atau gelas ukur steril;
- c) gunakan vakum untuk menyaring contoh melalui membran dan saring contoh seluruhnya;
- d) bilas seluruh permukaan dalam corong penyaring dengan air suling steril yang jumlahnya sama dengan jumlah contoh yang disaring, dan saring cairan pembilas. Sesudah pembilasan selesai hentikan vakum;
- e) buka kembali peralatan penyaring dengan pinset yang steril angkat membran penyaring dari alat penyaring;
- f) letakkan membran penyaring di atas perbenihan plate count agar dalam cawan petri (usahakan jangan ada gelembung udara di bawah membran);
- g) inkubasikan cawan petri dengan posisi terbalik dalam inkubator pada suhu $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama 48 jam; dan
- h) hitung jumlah koloni yang terbentuk pada filter yang menyatakan jumlah angka lempeng total) dalam 100 mL contoh.

A.27.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/mL) = $n \times F$

Keterangan:

- n adalah rata-rata koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per mililiter (koloni/mL);
F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

A.27.6 Pernyataan hasil

A.27.6.1 Cara menghitung

- a) Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per mililiter;
- b) jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per mililiter;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
120	25
105	20

$$\text{ALT} = \frac{120 + 105 + 25}{\left[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2} \right]} = 124,9375$$

- c) jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per mililiter dengan rumus:

$$ALT = \frac{\sum C}{\left[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d \right]}$$

Keterangan:

- C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri;
 n_1 adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung;
 n_2 adalah jumlah petri dari pengenceran kedua; dan
d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{\left[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2} \right]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
- jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1000 \times 640 = 640.000 (6.4 \times 10^5)$

- jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya: area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2 contoh :

10^{-2}	10^{-3}	area (cm^2)	jumlah bakteri perkiraan
~	7150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6500.000 (6.5 \times 10^6)$
~	6490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5900.000 (5.9 \times 10^6)$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan
- f) menghitung koloni yang merambat.

Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :

- perambatan berupa rantai yang tidak terpisah;
- perambatan yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan; dan
- perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan pembenihan.

Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk lebih dari satu rantai, dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.

A.27.6.2 Cara membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

- Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
- jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
- jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut

- bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
- bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

A.28 Bakteri *Coliform* dan *Escherichia coli*

A.28.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Coliform* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung *Durham*, sedangkan pertumbuhan bakteri *E. coli* diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

A.28.2 Peralatan

- Inkubator (35 ± 1) °C, terkalibrasi;
- Penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, ($45,5 \pm 0,2$) °C;
- Rak untuk tabung reaksi;
- Pipet ukur 10 mL berskala 1 mL dan 1 mL berskala 0,1 mL steril;
- Botol pengencer terbuat dari gelas borosilikat, dengan tutup ulir plastik;
- Tabung reaksi
- Tabung *Durham*;
- Cawan petri gelas/plastik steril (ukuran 15 mm x 100 mm atau 15 mm x 90 mm); dan
- Jarum Ose, dengan diameter dalam kira-kira 3 mm.

A.28.3 Pembenihan pengencer dan pereaksi

- Lauryl sulfate tryptose (LST) broth* / *Lauryl tryptose (LT) broth*;
- Brilliant green lactose bile (BGLB) broth* 2 %;
- Escherichia coli (EC) broth*;
- Agar *Levine's eosin methylene blue (L-EMB)*;
- Plate count agar (PCA)*;
- Gram stain*;
- Tryptone (tryptophane) broth*;
- Pereaksi *Kovacs'*;
- Methyl red – Voges Proskauer (MR – VP) broth*;
- Pereaksi *Voges Proskauer*;
- Larutan merah metil;
- Koser's citrate broth*;
- Peptone diluents* 0,1 %;
- Pereaksi indol;
- Larutan kalium hidroksida, KOH 40 %;
- Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB)*;
- Larutan *alfa naftol* 5 %; dan
- Kristal kreatin.

A.28.4 Cara kerja

A.28.4.1 APM – Uji pendugaan untuk bakteri *Coliform*

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan A.26;
- inokulasikan masing-masing 1 mL larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *lauryl sulfate tryptose (LST) broth* yang di dalamnya terdapat tabung *Durham* terbalik. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet

- menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu 35 °C selama (48 ± 2) jam;
 - amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke-(24 ± 2). Jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
 - tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "negatif", lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
 - catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun setelah inkubasi (48 ± 2) jam, dan nyatakan tabung tersebut "positif"; dan
 - lakukan uji penegasan terhadap semua tabung yang positif dalam uji pendugaan.

A.28.4.2 APM - Uji penegasan untuk bakteri *Coliform*

- Kocok tabung LST *broth* yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST *broth* yang positif ke dalam tabung BGLB *broth* 2 % yang berlainan;
- masukkan tabung-tabung BGLB *broth* 2 % ke dalam inkubator pada suhu 35 °C selama (48 ± 2) jam;
- Tentukan APM sesuai dengan Tabel A.1 berdasarkan jumlah tabung BGLB *broth* yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama (48 ± 2) jam pada 35 °C; dan
- laporkan bakteri *Coliform* sebagai APM per 100 mililiter.

Tabel A.1 - APM/100 mL contoh bila menggunakan 3 x 5 tabung untuk setiap pengenceran 10 mL/100 mL; 1,0 mL/100 mL; dan 0,1 mL/ 100 mL.

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
10	1,0	0,1		10	1,0	0,1	
0	0	0	< 1,8	4	0	3	25
0	0	1	1,8	4	1	0	17
0	1	0	1,8	4	1	1	21
0	1	1	3,6	4	1	2	26
0	2	0	3,7	4	1	3	31
0	2	1	5,5	4	2	0	22
0	3	0	5,6	4	2	1	26
1	0	0	2,0	4	2	2	32
1	0	1	4,0	4	2	3	38
1	0	2	6,0	4	3	0	27
1	1	0	4,0	4	3	1	33
1	1	1	6,1	4	3	2	39
1	1	2	8,1	4	4	0	34
1	2	0	6,1	4	4	1	40
1	2	1	8,2	4	4	2	47
1	3	0	8,3	4	5	0	41
1	3	1	10	4	5	1	48
1	4	0	10	5	0	0	23
2	0	0	4,5	5	0	1	31

Tabel A.1 - APM/100 mL contoh bila menggunakan 3 x 5 tabung untuk setiap pengenceran 10 mL/100 mL; 1,0 mL/100 mL; dan 0,1 mL/ 100 mL (lanjutan)

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
10	1,0	0,1		10	1,0	0,1	
2	0	1	6,8	5	0	2	43
2	0	2	9,1	5	0	3	58
2	1	0	6,8	5	1	0	33
2	1	1	9,2	5	1	1	46
2	1	2	12	5	1	2	63
2	2	0	9,3	5	1	3	84
2	2	1	12	5	2	0	49
2	2	2	14	5	2	1	70
2	3	0	12	5	2	2	94
2	3	1	14	5	2	3	120
2	4	0	15	5	2	4	150
3	0	0	7,8	5	3	0	79
3	0	1	11	5	3	1	110
3	0	2	13	5	3	2	140
3	1	0	11	5	3	3	170
3	1	1	14	5	3	4	210
3	1	2	17	5	4	0	130
3	2	0	14	5	4	1	170
3	2	1	17	5	4	2	220
3	2	2	20	5	4	3	280
3	3	0	17	5	4	4	350
3	3	1	21	5	4	5	430
3	3	2	24	5	5	0	240
3	4	0	21	5	5	1	350
3	4	1	24	5	5	2	540
3	5	0	25	5	5	3	920
4	0	0	13	5	5	4	1600
4	0	1	17	5	5	5	>1600
4	0	2	21				

A.28.4.3 APM – Uji penegasan untuk *Escherichia coli*

- Pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST *broth* yang positif ke dalam tabung EC *broth* yang berlainan;
- inkubasikan tabung EC *broth* tersebut ke dalam penangas air yang bersirkulasi, selama (24 ± 2) jam pada suhu $(45,5 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$, tabung yang telah terbentuk gas dinyatakan positif;
- apabila negatif, inkubasikan dan periksa kembali pada jam ke- (48 ± 2) . Jika telah terbentuk gas maka tabung tersebut dinyatakan positif; dan
- Lakukan uji lengkap terhadap semua tabung yang positif untuk uji penegasan.

A.28.4.4 APM – Uji lengkap untuk *Escherichia coli*

- Kocok tabung-tabung EC *broth* yang positif secara hati-hati,
- ambil koloni sebesar satu mata Ose, kemudian digoreskan/ditanamkan pada satu cawan agar L-EMB, sedemikian rupa hingga dihasilkan koloni yang terpisah-pisah dengan jarak minimal 0,5 cm,

- c) inkubasikan cawan agar L-EMB tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$,
- d) periksa cawan-cawan terhadap adanya koloni yang berwarna gelap dengan atau tanpa kilat logam,
- e) dari tiap cawan agar L-EMB, pindahkan maksimal 5 koloni yang diduga *E. coli* pada tabung agar miring PCA,
- f) inkubasikan tabung-tabung agar miring tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$ dan gunakan untuk uji selanjutnya,
- g) buatlah pewarnaan Gram dari tiap biakan. *E. coli* adalah gram negatif dan berbentuk batang tak berspora yang harus diuji menggunakan reaksi-reaksi IMVIC seperti dibawah ini serta harus diinokulasikan kembali ke tabung LST *broth* untuk menegaskan adanya produksi gas,
 - uji indol
 - Inokulasi tabung *tryptophane broth*,
 - inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$,
 - uji terbentuknya indol dilakukan dengan menambahkan 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL pereaksi Kovacs', dan
 - uji indol adalah positif bila terbentuk warna merah pada lapisan atas.
 - uji *Voges Proskauer*
 - Inokulasi tabung medium MR-VP *broth* dari setiap tabung PCA dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$,
 - pindahkan 1 mL biakan secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril,
 - tambahkan 0,6 mL larutan *alfa naftol* 5% dalam alkohol dan 0,2 mL larutan KOH 40% serta beberapa butir kristal kreatin, dan
 - uji *Voges Proskauer* adalah positif bila terbentuk warna eosin merah muda dalam waktu 2 jam.
 - uji merah metil
 - Setelah uji *Voges Proskauer*, inkubasikan kembali tabung MR-VP *broth* selama (48 ± 2) jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$;
 - tambahkan 5 tetes indikator merah metil pada setiap tabung, dan
 - uji merah metil adalah positif bila terbentuk warna merah dan negatif bila terbentuk warna kuning.
 - uji sitrat
 - Inokulasi tabung *Koser's citrate broth* dengan menggunakan jarum lurus sedemikian rupa sehingga hanya mengenai permukaan media. Terlalu banyak inokulasi dapat menyebabkan terbawanya zat-zat lain,
 - inkubasikan selama 96 jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$, dan
 - uji sitrat adalah positif bila terbentuk kekeruhan yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dalam tabung.
 - Uji pembentukan gas dari *Lactose*
 - Inokulasikan tabung LST dari setiap agar miring PCA. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$, dan
- h) perik Kocok tabung-tabung EC *broth* yang positif secara hati-hati;
- i) ambil koloni sebesar satu mata Ose kemudian digoreskan/ditanamkan pada satu cawan agar L-EMB, sedemikian rupa hingga dihasilkan koloni yang terpisah-pisah dengan jarak minimal 0,5 cm;
- j) inkubasikan cawan agar L-EMB tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- k) periksa cawan-cawan terhadap adanya koloni yang berwarna gelap dengan atau tanpa kilat logam;
- l) dari tiap cawan agar L-EMB, pindahkan maksimal 5 koloni yang diDuga *E.coli* pada tabung agar miring PCA;
- m) inkubasikan tabung-tabung agar miring tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$ dan gunakan untuk uji selanjutnya;

- n) buatlah pewarnaan Gram dari tiap biakan. *E. coli* adalah Gram negatif dan berbentuk batang tak berspora yang harus diuji menggunakan reaksi-reaksi IMVIC seperti di bawah ini, serta harus diinokulasikan kembali ke tabung LST *broth* untuk menegaskan adanya produksi gas:
- uji indol ;
 - Inokulasi tabung *tryptone (tryptophane) broth* dari setiap tabung PCA;
 - inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
 - uji terbentuknya indol dilakukan dengan menambahkan 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL pereaksi *Kovacs'*; dan
 - uji adalah positif bila terbentuk warna merah pada lapisan atas.
 - uji *Voges Proskauer* ;
 - Inokulasi tabung media MR-VP *broth* dari setiap tabung PCA dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
 - pindahkan 1 mL biakan secara aseptik ke dalam tabung reaksi steril;
 - tambahkan 0,6 mL larutan alfa naftol 5% dalam alkohol, dan 0,2 mL larutan KOH 40%, serta beberapa butir kristal kreatin, dan kocok;
 - uji *Voges Proskauer* adalah positif bila terbentuk warna eosin merah muda dalam waktu 2 jam.
 - uji merah metil;
 - Setelah uji *Voges Proskauer*, inkubasikan kembali tabung MR-VP *broth* selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
 - tambahkan 5 tetes indikator merah metil pada setiap tabung; dan
 - uji merah metil adalah positif bila terbentuk warna merah, dan negatif bila terbentuk warna kuning.
 - penggunaan sitrat;
 - Inokulasi tabung *Koser's citrate broth* dengan hati-hati menggunakan jarum lurus sedemikian rupa sehingga hanya mengenai permukaan media. Terlalu banyak inokulasi dapat menyebabkan terbawanya zat-zat lain;
 - inkubasikan selama 96 jam pada suhu 35°C ; dan
 - uji sitrat adalah positif bila terbentuk kekeruhan yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dalam tabung.
 - Uji pembentukan gas dari laktosa.
 - Inokulasikan tabung LST *broth* dari setiap agar miring PCA. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , dan
 - periksa tabung-tabung itu terhadap adanya pembentukan gas.
 - sa tabung tabung itu terhadap adanya pembentukan gas.

A.28.4.5 Klasifikasi dan laporan

Tabel A.2 - Reaksi biokimia *Escherichia coli* pada uji IMVIC

<i>Escherichia coli</i>	Indol	Merah metil	<i>Voges Proskauer</i>	Sitrat
Varitas I	+	+	-	-
Varitas II	-	+	-	-

- a) Nyatakan positif/100 mL sebagai bakteri *E. coli* jika hasil uji lengkap memenuhi kriteria:
- uji IMVIC mengikuti pola + + - - atau - + - -, sesuai Tabel A.2;
 - pewarnaan Gram menunjukkan Gram negatif bentuk batang tidak berspora, dan
 - terbentuknya gas dalam LST *broth* dengan waktu inkubasi (48 ± 2) jam pada suhu 35°C
- b) Apabila tidak memenuhi kriteria di atas, maka nyatakan hasil bakteri *E. coli* sebagai negatif/100 mL.

A.29 *Salmonella* sp.**A.29.1 Prinsip**

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan ditegaskan melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella* sp.

A.29.2 Peralatan

- a) Inkubator (35 ± 2) °C;
- b) Inkubator *refrigerated* atau *laboratory refrigerator* (4 ± 2) °C;
- c) Otoklaf;
- d) Oven;
- e) Neraca, kapasitas 2 000 g, dengan ketelitian 0,1 g;
- f) Neraca, kapasitas 120 g, dengan ketelitian 5 mg;
- g) Penangas air, (49 ± 1) °C;
- h) Penangas air, bersirkulasi, *thermostatically-controlled*, ($42 \pm 0,2$) °C;
- i) pH meter;
- j) Blender dan blender jar (botol) steril;
- k) Botol bertutup ulir bermulut lebar (500 mL) steril, labu Erlenmeyer 500 mL steril, *beaker* 250 mL steril, *sterile glass* atau *paper funnels* dengan ukuran sesuai, dan pilihan lain, kontainer dengan kapasitas sesuai untuk mengakomodasi contoh komposit;
- l) *Bent glass* atau batang penyebar plastik steril;
- m) Sendok steril, atau peralatan lain untuk memindahkan contoh makanan;
- n) Cawan petri steril, (15 x 100) mm, kaca atau plastik;
- o) Pipet steril 1 mL dengan ketelitian 0,01 mL; dan pipet steril 5 mL dan 10 mL dengan skala 0,1 mL;
- p) Jarum Ose (diameter ± 3 mm), terbuat dari *nichrome*, *platinum-iridium chromel wire* atau plastik steril;
- q) Jarum Ose yang berujung runcing;
- r) Tabung reaksi atau tabung biakan steril (16 x 150) mm dan (20 x 150) mm; tabung serologikal (10 x 75) mm atau (13 x 100) mm;
- s) Botol pengencer 500 mL;
- t) Rak tabung reaksi atau rak tabung biakan;
- u) *Vortex mixer*;
- v) Lampu (untuk mengamati reaksi serologi);
- w) *Fisher* atau *Bunsen burner*;
- x) Kertas pH (kisaran pH 6 sampai dengan 8) dengan ketelitian maksimal 0,4 unit pH per perubahan warna; dan
- y) Gunting, gunting besar, pisau bedah, dan *forceps* steril.

A.29.3 Perbenihan dan pereaksi

- a) *Reconstituted Nonfat dry milk*;
- b) *Tetrathionate* (TT) *broth*;
- c) Media *Rappaport-Vassiliadis* (RV) (media RV harus dibuat dari bahan-bahan yang terdapat dalam komposisi media RV tersebut. Formulasi yang tersedia secara komersial tidak dapat diterima);
- d) Agar *Xylose lysine desoxycholate* (XLD) ;
- e) Agar *Hektoen enteric* (HE);
- f) Agar *Bismuth sulfite* (BS);
- g) Agar *Triple sugar iron* (TSI);

- h) *Tryptone* (atau *tryptophane*) *broth* (TB);
- i) *Trypticase soy-tryptose broth* (TSTB);
- j) *Methyl red-Voges Proskeaur* (MR-VP) *broth*
- k) *Agar Simmons citrate*;
- l) *Urea broth*;
- m) *Rapid urea broth*;
- n) *Malonate broth*;
- o) *Lysine iron agar* (LIA) (Edward dan Fife)
- p) *Lysine decarboxylase broth* (LDB);
- q) *Potassium cyanide* (KCN) *broth*;
- r) *Phenol red carbohydrate broth* (*Phenol red lactose broth* dan *Phenol red red sucrose broth*) atau *Purple carbohydrate broth* (*Purple lactose broth* dan *Purple sucrose broth*);
- s) *Phenol red dulcitol* atau *Purple broth base* dengan 0,5 % *dulcitol*;
- t) *Agar MacConkey*;
- u) *Brain heart infusion* (BHI) *broth*;
- v) *Tryptose blood agar base*;
- w) Pereaksi Kovacs';
- x) Pereaksi uji Voges-Proskauer (VP);
- y) Kristal kreatin fosfat;
- z) Larutan potasium hidroksida (KOH), 40 %;
- aa) Larutan *bromocresol purple dye*, 0,2 %;
- bb) Indikator merah metil;
- cc) Indikator *phenol red* atau *bromocresol purple*;
- dd) Air suling steril;
- ee) Larutan *physiological saline*, 0,85 % (steril);
- ff) Larutan *formanilized physiological saline*;
- gg) *Formanilized antigen*;
- hh) Alfa naftol;
- ii) *Salmonella polyvalent somatic* (O) *antiserum*;
- gg) *Salmonella polyvalent flagellar* (H) *antiserum*;
- kk) *Salmonella polyvalent somatic* (O) *antiserum*; dan
- ll) *Salmonella somatic group* (O) *antisera*: A, B, C₁, C₂, C₃, D₁, D₂, E₁, E₂, E₃, E₄, F, G, H, I, Vi, atau kelompok lain yang sesuai.

A.29.4 Cara Kerja

A.29.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan

- a) Pipet 100 mL contoh ke dalam blender yang steril dan tambahkan 900 mL *universal preenrichment broth* steril. Kocok selama 2 menit;
- b) pindahkan secara aseptik ke dalam botol pengencer 1 000 mL dan biarkan pada suhu ruang selama (60 ± 5) menit dengan wadah tertutup, kemudian kocok perlahan;
- c) tambahkan 0,45 mL larutan *Briliant green dye* 1%, kocok hingga tercampur merata; dan
- d) kendurkan tutup wadah secukupnya ¼ putaran. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada 35 °C.

A.29.4.2 Pengkayaan

- a) Kencangkan tutup wadah dan kocok secara perlahan contoh yang telah selesai diinkubasi;
- b) pipet 0,1 mL biakan pra-pengkayaan kedalam 10 mL media Rappaport-Vassiliadis (RV) dan 1 mL biakan pra-pengkayaan lainnya ke dalam 10 mL *tetrathionate* (TT) *broth* dan vortex masing-masing campuran tersebut; dan
- c) inkubasikan media RV pada suhu (42 ± 0,2) °C selama (24 ± 2) jam dalam penangas air bersirkulasi dan TT *broth* pada (35 ± 2,0) °C selama (24 ± 2) jam.

A.29.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif

- a) Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum Ose 3 mm, goreskan biakan pengkayaan TT *broth* ke dalam cawan petri yang berisi media agar XLD, HE dan BS. Siapkan agar BS sehari sebelum digunakan dan simpan di tempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores.
- b) ulangi cara di atas dari media agar pengkayaan RV;
- c) inkubasikan cawan-cawan media agar BS, HE dan XLD selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
- d) amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella* sp., setelah inkubasi (24 ± 2) jam; Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella* sp. dari masing-masing media agar selektif setelah (24 ± 2) jam inkubasi. Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:
 - XLD : koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.
 - HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.
 - BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam. Jika masa inkubasi bertambah maka warna media disekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.
- e) jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media agar BS setelah inkubasi (24 ± 2) jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama (24 ± 2) jam. Jika tidak ada koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media agar BS setelah inkubasi (48 ± 2) jam, ambil 2 atau lebih koloni tersebut;
- f) dengan menggunakan jarum Ose berujung runcing steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan kedalam media agar miring TSI dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Tanpa mengambil koloni baru, gunakan jarum yang sama untuk menginokulasikan media LIA dengan cara menusuk agar tegak lebih dahulu, setelah itu goreskan pada agar miring. Karena reaksi *Lysine decarboxylase* sangat anaerobik, agar miring LIA harus mempunyai tusukan yang dalam (4 cm). Simpan media agar selektif yang telah diambil koloni pada suhu $(5 - 8)^{\circ}\text{C}$;
- g) inkubasi agar miring TSI dan LIA pada suhu 35°C selama (24 ± 2) jam dengan membiarkan tutup sedikit kendur untuk mencegah terbentuknya H_2S yang berlebihan. Pada TSI, biakan *Salmonella* sp. akan menghasilkan alkalin (merah) pada media agar miring dan asam (kuning) pada tusukan agar tegak, dengan atau tanpa memproduksi H_2S (warna kehitaman pada agar). Pada LIA biakan *Salmonella* sp. akan menghasilkan reaksi alkalin (ungu) pada tusukan pada agar tegak. Reaksi yang benar-benar kuning pada tusukan dinyatakan sebagai negatif. Jangan hanya melihat perubahan warna pada tusukan untuk menyatakan negatif. Umumnya biakan *Salmonella* sp. membentuk H_2S pada LIA. Beberapa biakan non *Salmonella* sp. membentuk reaksi merah bata pada agar miring LIA;
- h) semua biakan yang memberikan reaksi alkalin pada bagian tusukan didalam media LIA tanpa memperhatikan reaksi TSI akan dianggap sebagai *Salmonella* sp. dan dilakukan uji biokimia dan serologi. Biakan yang menghasilkan asam pada tusukan pada media agar tegak LIA dan alkalin pada agar miring serta reaksi asam pada tusukan pada media agar tegak TSI harus dipertimbangkan juga sebagai *Salmonella* sp. dan harus dilakukan uji biokimia dan serologi. Biakan yang memberikan reaksi asam pada tusukan di media agar tegak LIA dan asam pada agar miring TSI, dan reaksi asam pada tusukannya di media agar tegak TSI dapat dinyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp.. Bila biakan TSI tidak menunjukkan reaksi khas *Salmonella* sp. (alkalin pada goresan dan asam pada tusukan), ulangi lagi pengujian dengan mengambil koloni yang diduga dari media selektif yang tidak memberikan biakan duga positif dan inokulasi dengan menggores media TSI dan LIA seperti cara mulai pasal f di atas; dan

- i) lakukan uji identifikasi biokimia dan serologi terhadap:
- tiga biakan presumtif TSI dari 1 set media agar selektif (HE, XLD dan BS) yang diinokulasi dari TTB, dan tiga biakan presumtif yang diinokulasikan dari RV;
 - jika tiga biakan presumtif positif TSI tidak terisolasi dari 1 set media agar selektif, uji presumtif positif TSI dari media agar yang lain. Uji sedikitnya 6 biakan TSI untuk setiap 100 mL contoh minuman.

A.29.5 Identifikasi *Salmonella* sp.

A.29.5.1 Biakan campuran

- a) Apabila biakan agar TSI terlihat tercampur, maka goreskan kembali ke dalam media agar *MacConkey*, HE atau XLD broth. Inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C . Amati koloni yang diduga *Salmonella* sp., yaitu :
- agar *Mac Conkey*. Koloni tampak transparan dan tidak berwarna, kadang-kadang dengan inti hitam. Koloni-koloni *Salmonella* sp. akan membentuk area yang terang pengendapan *bile* disebabkan oleh bakteri lain yang muncul atau tumbuh;
 - agar *hektoen enteric* (HE). Koloni-koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya biakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam; dan
 - agar *xylose lysine desoxycholate* (XLD). Koloni merah muda dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya biakan *Salmonella* sp. membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.
- b) pindahkan sedikitnya 2 koloni yang diduga *Salmonella* sp. pada media TSI dan LIA sesuai dengan A.29.4.3.f dan lanjutkan sesuai dengan A.29.4.3.g.

A.29.5.2 Biakan murni

- a) Uji urease (konvensional); dan
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* sp. dari media agar miring TSI dengan jarum Ose ke dalam tabung *urea broth*. Karena kadang-kadang tabung *urea broth* yang tidak diinokulasikan biakan akan berubah warna menjadi merah keunguan (uji positif) maka perlu dibuat tabung *urea broth* tanpa inokulasi sebagai kontrol. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C ; dan
- b) Uji urease (cepat).
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* sp. dari media agar miring TSI dengan jarum Ose berdiameter 3 mm ke dalam tabung *rapid urea Broth*. Inkubasikan 2 jam dalam penangas air pada suhu $(37 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$. Biarkan *Salmonella* sp. akan memberikan hasil negatif (tidak terjadi perubahan warna) pada uji urease, walaupun demikian perlu uji lebih lanjut.

A.29.5.3 Pengujian biakan urease negatif

- a) *Lysine decarboxylase* (LD) broth;
Uji ini dilakukan hanya jika reaksi LIA meragukan. Ambil 1 Ose koloni yang diduga *Salmonella* sp. dari agar miring TSI dan inokulasikan ke dalam media LDB. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam. *Salmonella* sp. memberikan reaksi alkalin ditandai dengan warna ungu pada seluruh media. Reaksi negatif ditunjukkan dengan warna kuning pada seluruh media. Jika hasil reaksi tidak menunjukkan warna kuning atau ungu tambahkan beberapa tetes 0,2 % *bromocresol purple dye* dan amati perubahan warnanya.
- b) *Phenol red dulcitol* atau *purple broth base* dengan 0,5 % *dulcitol*; dan
inokulasi media *dulcitol broth* dari biakan TSI. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah inkubasi 24 jam. Pada umumnya *Salmonella* sp. memberikan hasil positif yang ditandai dengan pembentukan gas dalam

tabung *Durham* dan pH asam (kuning) pada media. Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung *Durham* dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.

c) *Tryptone (tryptophane) broth* (TB);

Inokulasi media *tryptone broth* dari biakan TSI. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 35 °C dan selanjutnya ikuti prosedur di bawah ini:

- *Potassium cyanide (KCN) broth*

Pindahkan 1 ose biakan dari TB 24 jam ke dalam media *KCN broth*. Tutup tabung rapat-rapat dan bila perlu dilapisi dengan parafin atau film. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C tetapi amati setelah 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan (ditandai dengan adanya kekeruhan). Umumnya *Salmonella* sp. tidak tumbuh pada media ini dengan ditandai dengan tidak terjadinya kekeruhan.

- *Malonate broth*

Pindahkan 1 mata ose dari biakan TB ke dalam media *Malonate broth*. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C, tetapi amati setelah 24 jam. Kadang-kadang tabung *malonate broth* yang tidak diinokulasi berubah menjadi biru. Oleh karena itu gunakan *malonate broth* sebagai kontrol. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi negatif (hijau atau tidak ada perubahan warna) pada *broth* ini.

- Uji indol

Dari media TB yang tersisa pindahkan 5 mL biakan ke dalam tabung reaksi steril, tambahkan 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL pereaksi Kovacs'. Amati segera setelah penambahan pereaksi. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi negatif (tidak terbentuk cincin merah pada permukaan media). Reaksi yang warnanya berada antara jingga dan merah muda dinyatakan sebagai positif.

Nyatakan biakan sebagai bukan *Salmonella* sp. bila reaksi indol positif dan *flagellar* (H) negatif, atau KCN positif dan LDB negatif;

A.29.5.4 Uji serologi *polyvalent flagellar* (H)

a) Inokulasi dari masing-masing agar TSI yang memberikan reaksi urease negatif ke dalam:

- *BHI broth*, dan inkubasi selama 4 jam sampai dengan 6 jam pada suhu 35 °C sampai terlihat pertumbuhan (untuk diuji pada hari yang sama); atau
- *Trypticase soy tryptose (TST) broth* dan inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C (untuk diuji hari berikutnya). Tambahkan 2,5 mL larutan *formanilized physiological saline* ke dalam 5 mL biakan di atas.

b) siapkan 2 biakan dari TSI (contoh dan kontrol) yang telah diberi *formanilized physiological saline* dan uji dengan *Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera. Masukkan $\pm 0,5$ mL larutan *saline Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera dalam tabung serologi 10 mm x 75 mm atau 13 mm x 100 mm. Tambahkan 0,5 mL antigen yang akan diuji. Siapkan kontrol *saline* dengan mencampur 0,5 mL *formanilized physiological saline* dengan 0,5 mL *formanilized* antigen. Inkubasikan campuran tersebut dalam penangas air pada suhu 48 °C sampai dengan 50 °C. Amati setiap interval waktu 15 menit dan amati hasilnya dalam 1 jam, sebagai berikut:

- Positif apabila terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol;
- negatif apabila tidak ada penggumpalan dalam uji campuran dan dalam kontrol; dan
- non spesifik terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan kontrol.

A.29.5.5 Uji serologi *polyvalent somatic* (o)

- a) Dengan menggunakan pensil, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- b) emulsikan biakan dari TSI miring umur 24 jam sampai dengan 48 jam dengan 2 mL 0,85% *saline* menggunakan jarum Ose (dapat juga menggunakan biakan dari *tryptose blood agar base* tanpa darah);
- c) tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil;
- d) tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes *polyvalent somatic* (o) antiserum ke dalam bagian yang lain;
- e) campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan jarum Ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- f) klasifikasi uji *polyvalent somatic* (o) menunjukkan hasil sebagai berikut:
 - Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;
 - negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji, dan kontrol *saline*; dan
 - non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran uji dan pada kontrol *saline*.

A.29.5.6 Uji biokimia tambahan

Nyatakan sebagai *Salmonella* sp., biakan yang memberikan reaksi yang khas sesuai dengan Tabel A.3 butir 1-11. Jika 1 biakan TSI dari setiap 100 mL contoh menunjukkan *Salmonella* sp., uji biokimia tambahan tidak diperlukan. Biakan yang memberikan reaksi positif pada uji serologi *flagellar* (H) tapi tidak menunjukkan karakteristik *Salmonella* sp. pada uji biokimia, harus dimurnikan sesuai dengan A.29.5.1 diatas dan uji kembali, sesuai dengan A.29.5.2 Lakukan uji tambahan berikut ini terhadap biakan yang tidak memberikan reaksi yang khas seperti Tabel A.4 :

- a) *Phenol red lactose* atau *purple lactose broth*;
 - inokulasi *broth* ini dengan biakan agar TSI miring yang telah diinkubasi selama 24 jam sampai 48 jam. Inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C, tetapi amati setelah 24 jam;
 - nyatakan positif, apabila terjadi pembentukan asam (kuning) dan gas pada tabung *Durham*. Apabila hanya terjadi pembentukan asam, maka dapat dinyatakan positif. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung *Durham* dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media;
 - jika biakan memberikan reaksi *lactose* positif, maka nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp., kecuali biakan yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif pada LIA atau reaksi positif pada *malonate broth*.
- b) *Phenol red sucrose* atau *purple sucrose broth*;
Ikuti prosedur sesuai dengan A.29.5. Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp. pada biakan yang memberikan reaksi positif uji sukrosa, kecuali biakan yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif (alkalin) pada LIA;
- c) *Methyl red-Voges-Proskauer* (MR-VP) *broth*; dan
Inokulasi media dengan sedikit biakan TSI agar miring dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C;
Lakukan uji *Voges-Proskauer* (VP) pada suhu ruang sebagai berikut :
 - Pindahkan 1 mL MR-VP *broth* yang telah diinkubasi selama (48 ± 2) jam ke dalam tabung reaksi steril dan inkubasikan kembali MR-VP *broth* selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C;
 - Tambahkan 0,6 mL alfa naftol dan aduk;

- Tambahkan 0,2 mL larutan KOH 40% dan aduk kembali. Untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kristal kreatin dan amati hasilnya setelah 4 jam; dan
 - Perubahan warna menjadi merah bata sampai merah delima pada media menunjukkan reaksi positif. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi VP negatif.
- d) Uji merah metil (MR)
- Tambahkan 5 tetes sampai dengan 6 tetes indikator merah metil ke dalam 5 mL media MR-VP yang telah diinkubasi selama 96 jam;
 - amati hasilnya dengan segera; dan
 - umumnya *Salmonella* sp. memberikan reaksi positif, ditandai dengan terjadinya difusi warna merah pada media. Terjadinya warna kuning menunjukkan reaksi negatif.
- Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* sp. biakan yang memberikan reaksi KCN dan VP positif serta MR negatif.
- e) Agar Simmons citrate.
- Inokulasi media dengan menggunakan jarum yang mengandung biakan dari agar miring TSI, dengan cara menggores agar miring dan menusuk bagian tegak. Inkubasikan selama (96 ± 2) jam pada suhu 35 °C;
 - nyatakan positif apabila terjadi pertumbuhan yang biasanya diikuti dengan perubahan warna dari hijau menjadi biru. Umumnya *Salmonella* sp. memberikan hasil sitrat positif; dan
 - negatif apabila tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna.

A.29.6 Pernyataan hasil

Laporkan sebagai *Salmonella* sp. biakan-biakan yang mempunyai reaksi seperti pada Tabel A.3. Laporkan sebagai bukan *Salmonella* sp. biakan-biakan yang memberikan reaksi seperti pada Tabel A.4. Bila tidak ada 1 biakan TSI yang menunjukkan reaksi *Salmonella* sp. pada uji biokimia, lakukan uji biokimia sesuai dengan A.29.5 terhadap biakan yang memberikan reaksi urease negatif dari contoh yang sama.

Tabel A.3 - Reaksi biokimia dan serologi untuk *Salmonella* sp.

No.	Substrat uji	Hasil reaksi		<i>Salmonella</i> sp. Reaksi species ^a
		Positif	Negatif	
1.	Glucose (TSI)	tusukan kuning	tusukan merah	+
2.	Lysine decarboxylase (LIA)	tusukan ungu	tusukan kuning	+
3.	H ₂ S (TSI dan LIA)	hitam	tidak hitam	+
4.	Urease	warna ungu sampai merah	tidak ada perubahan warna	-
5.	Lysine decarboxy broth	warna ungu	warna kuning	+
6.	Phenol red dulcitol broth	warna kuning dan/atau gas	tanpa/ tidak berbentuk gas, tidak berubah warna	+ ^b
7.	KCN broth	pertumbuhan	tidak ada pertumbuhan	-
8.	Malonate broth	warna biru	tidak berubah warna	- ^c
9.	Uji indol	permukaan bewarna nila	permukaan bewarna kuning	-
10.	Uji polyvalent flagellar	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
11.	Uji polyvalent somatic	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
12.	Phenol red lactose broth	warna kuning dan/atau gas	tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	- ^c
13.	Phenol red sucrose broth	warna kuning dan/atau gas	tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	-
14.	Uji Voges-Proskauer	merah muda sampai merah	tidak berubah warna	-

Tabel A.4 Lanjutan

No.	Substrat uji	Hasil reaksi		Salmonella sp. Reaksi species ^a
		Positif	Negatif	
15	Uji <i>methyl red</i>	merah menyebar	Kuning menyebar	+
16	<i>Simmons citrate</i>	pertumbuhan, warna biru	tidak ada pertumbuhan dan perubahan warna	V

Keterangan:
^a+ adalah 90% atau lebih positif dalam satu atau dua hari;
 - adalah 90% atau lebih negatif dalam satu atau dua hari;
 V adalah variabel;
^b adalah mayoritas dari biakan *Salmonella arizonae*: negatif; dan
^c adalah mayoritas dari biakan *Salmonella arizonae*: positif.

Tabel A.4 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non *Salmonella* sp.

No	substrat uji	Hasil
1	<i>Urease</i>	positif (warna ungu-merah)
2	Uji <i>indol</i> dan <i>polivalent flagellar</i> (H) atau uji <i>indol</i> dan uji Spicer Edwards <i>flagellar</i>	positif (permukaan warna nila) negatif (tidak ada penggumpalan) positif (permukaan warna nila) negatif (tidak ada penggumpalan)
3	<i>Lysine decarboxylase</i> dan <i>KCN broth</i>	positif (ada pertumbuhan) negatif (warna kuning)
4	<i>Phenol red lactose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas) ^{a,b}
5	<i>Phenol red sucrose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas) ^b
6	<i>KCN broth</i> , uji <i>Voges-Proskauer</i> , dan <i>methyl red</i>	positif (ada pertumbuhan) positif (warna merah muda sampai merah) negatif (warna kuning menyebar)

Keterangan:
^a adalah uji *malonate broth* lebih lanjut pada biakan yang positif untuk menentukan *Salmonella arizonae*
^b adalah jangan dibuang biakan positif jika biakan LIA menunjukkan reaksi bercirikan *Salmonella* sp., uji lebih lanjut untuk mengamati apakah spesies tersebut *Salmonella* sp..

A.30 *Pseudomonas aeruginosa* (Metode penyaringan membran)

A.30.1 Prinsip

Pertumbuhan *P. aeruginosa* pada penyaringan membran dengan penampakan rata dengan pinggiran luar terang/cerah dari bintik coklat sampai hijau hitam di tengah setelah diinkubasikan pada suhu (41,5 ± 0,5) °C selama 72 jam dalam pembenihan yang cocok.

A.30.2 Peralatan

- Inkubator (41,5 ± 0,5) °C;
- Gelas ukur 100 mL;
- Pipet 100 mL terkalibrasi;
- Cawan petri 50 mm x 12 mm;
- Unit alat penyaringan dan saringan membran 0,45 µm; dan
- Pipet steril.

A.30.3 Perbenihan

a). M-PA agar

agar ini dapat disiapkan dari bahan dasar sebagai berikut :

1. L-Lisin HCL	0,5 g
2. Natrium klorida NaCl	0,5 g
3. Ekstrak ragi	2,0 g
4. Ksilosa	2,5 g
5. Sukrosa	1,25 g
6. Laktosa	1,25 g
7. Merah Fenol	0,08 g
8. Feri ammonium sitrat	0,8 g
9. Natrium tio sulfat, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	6,8 g
10. Agar	15,0 g
11. Air suling	1L

Larutkan semua bahan-bahan dalam air suling, atur pH ($6,5 \pm 1$) °C, sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, setelah steril dinginkan sampai suhu 55 °C – 60 °C. Atur pH kembali menjadi ($7,1 \pm 2$) °C. Tambahkan anti biotik kering sulfapiridin 176 mg; kanamisin 8,5 mg; nalidixic acid 37,0 mg; dan dikloheksamida 150 mg untuk 1 L perbenihan tersebut. Sesudah semua anti biotik tercampur, tuang sebanyak 3 ml perbenihan ke dalam cawan petri berukuran 50 mm x 12 mm. Simpan cawan yang berisi perbenihan tersebut pada suhu 2 °C sampai dengan 10 °C. Buang perbenihan yang tidak terpakai sesudah satu bulan penyimpanan.

b). Modifikasi MPA agar

(MPAC agar yang masih tersedia secara komersial sudah mengandung magnesium, sulfat, kanamisin dan nalidixic acid)

c) Agar susu (milk agar)

Bagian A

Susu Instan tidak berlemak atau sejenisnya	100 g
Air suling	500 mL

Bagian B

Nutrient broth	12,5 g
Natrium klorida, NaCl	2,5 g
Agar	15,0 g
Air suling	500 mL

Sterilisasi bagian A dan B secara terpisah, setelah steril cepat dinginkan sampai 55 °C. Secara aseptik campurkan bagian A dan B. Lalu tuangkan lebih kurang 200 mL perbenihan ke dalam cawan petri berukuran 100 mm x 15 mm

A.30.4 Cara kerja

a) Uji Pendugaan

- Pasang peralatan penyaring membran yang terdiri dari corong, membran penyaring dan penampung yang telah disterilkan lebih dahulu dan hubungkan dengan sistem vakum;
- masukan 200 mL contoh ke dalam corong dari alat penyaring dengan menggunakan gelas ukur steril;
- gunakan vakum untuk penyaring contoh melalui membran dan saring contoh seluruhnya;
- bilas seluruh permukaan dalam corong penyaring dengan air suling steril yang jumlahnya sama dengan jumlah contoh yang disaring. Saring cairan pembilas kemudian hentikan vakum setelah pembilasan selesai;
- buka kembali peralatan penyaring dan dengan pinset yang steril angkat membran penyaring dari alat penyaring;

- letakkan membran penyaring diatas perbenihan M-PA (usahakan jangan ada gelembung udara dibawah membran);
 - inkubasikan cawan dengan posisi terbalik pada suhu $(41,5 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ selama 72 jam;
 - amati koloni yang diduga *P. aeruginosa* dengan ciri-ciri sebagai berikut: koloni dengan diameter 0,8 mm sampai dengan 2,2 mm, penampakan rata dengan pinggiran luar terang dan bintik coklat sampai hijau hitam di tengah. Hitung koloni yang diduga dari membran penyaring yang mengandung 20 koloni sampai dengan 80 koloni.
- b) Uji penegasan
- Gores koloni yang diduga di atas permukaan perbenihan agar susu sepanjang 2 cm sampai dengan 4 cm.
 - Inkubasikan cawan tersebut dengan posisi terbalik pada suhu $(36 ^\circ\text{C} \pm 1 ^\circ\text{C})$ selama 24 jam.
 - *P. aeruginosa* menghidrolisis kasein dan menghasilkan *diffusible* pigmen yang menyebar berwarna kuning sampai hijau.

A.30.5 Perhitungan

Hitung dan catat jumlah koloni *P.aeruginosa* / 100 mL.



Bibliografi

Standard Methods For The Examination of Water and wastewater. American Public Health Association; American Water Works association: Water Environment Federation. 20th Ed. Washington DC, APHA, 1998 yaitu :

2120. Color, B. Visual comparison Method.

2130. Turbidity. B Nephelo Metric Method.

4500. H⁺. pH Value. B. Electrometric Method.

2540. B. Total Solid Dried.

4500. KMnO₄. Potassium Permanganate. B. Spectrophotometric Method.

4500. NO₃⁻. Nitrogen (Nitrate). B. Ultraviolet Persulfate Spectrophotometric Screening Method.

4500. NO₃. Nitrogen (Nitrite). B. Colorimetric Method.

4500. SO₄²⁻. Sulfate. E. Turbidimetric Method.

4500. Cl⁻. Chloride. B. Argentometric Method.

4500. CN. Cyanide. E. Colorimetric Method.

3500. Fe. Iron. Electrothermal Atomic Absorption (3113B) and ICP Method (3120)

3500. Mn. Manganese. Electrothermal Atomic Absorption (3113B) and ICP Method (3120 and 3125).

4500. Cl. Chlorine (Residual). G. DPD. Colorimetric Method.

3500. Cr. Chromium. Electrothermal Atomic Absorption (3113B) and ICP Method (3120).

3500. Ba. Barium. Electrothermal Atomic Absorption (3113B) and ICP Method (3120).

3500. B. Boron. ICP Method (3120). Curcumin Method (B)

3500. Se. Selenium. Electrothermal Atomic Absorption (3113B), Hydride Generation Atomic Absorption Method (3114 B and C) ICP Method (3120).

3500. Pb. Lead. Electrothermal Atomic Absorption (3113B) and ICP Method (3120).

3500. Cu. Copper. Electrothermal Atomic Absorption (3113B) and ICP Method (3120).

3500. Cd. Cadmium. Electrothermal Atomic Absorption (3113B) and ICP Method (3120).

3500. Hg. Mercury. Spectrophotometric Atomic Absorption.

3500. Ag. Silver. Electrothermal Atomic Absorption (3113B) and ICP Method (3120).

3500. Co. Cobalt. Electrothermal Atomic Absorption (3113B) and ICP Method (3120).

3500. As. Arsenic. *Electrothermal Atomic Absorption (3113B), Hydride Generation Atomic Absorption Method (3114 B).*

9215. *Heterotrophic. Plate Count. D. Membrane Filter Method.*

9222. *Membrane Filter Technique Members of The Coliform Group.*

9260. *Detection of Pathogenic Bacteria. B. General Qualitative Isolation and Identification Procedure for Salmonella.*

9213. *Recreational Waters. E. Membrane Filter Technique for Pseudomonas Aeruginosa*

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Aerobic Plate Count.* Chapter 3.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2002. *Enumeration of Escherichia coli and The Coliform Bacteria.* Chapter 4.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2003. *Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate.* Chapter 1.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2007. *Salmonella sp.* Chapter 5.

